



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

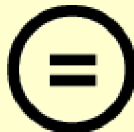
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

이리도바이러스에 인위 감염된
쏘가리(*Siniperca scherzeri*)의
면역유전자 발현 특성



2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

신 기 원 이 학 석 사 학 위 논 문

이리도바이러스에 인위 감염된
쏘가리(*Siniperca scherzeri*)의
면역유전자 발현 특성

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

신 기 원

신기원의 이학석사 학위논문을 인준함

2012년 2월 24일



주 심 농 학 박 사 허 민 도



위 원 약 학 박 사 정 준 기



위 원 이 학 박 사 정 현 도



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험어	5
2. 바이러스 공격실험	5
2-1. 바이러스	5
2-2. Viral DNA의 분리	6
2-3. PCR(Polymerase chain reaction) 증폭	6
2-3-1. Primary PCR 증폭	7
2-3-2. Nested PCR 증폭	8
2-4. 주사액의 준비	8
2-5. 공격 실험	8
2-5-1. 면역유전자의 발현변화 측정을 위한 공격실험	8
2-5-2. 바이러스 농도별 누적폐사율 측정을 위한 공격실험	9
3. 누적 폐사율의 측정	9
4. 면역유전자 발현의 측정	12
4-1. 바이러스 공격 후 0, 1, 4, 10일째 시료채취 실시	12
4-2. Total RNA 분리	12
4-3. RT-PCR 실시	13
4-4. 클로닝	13
4-4-1. Degenerated 프라이머 제작 및 PCR 증폭	13
4-4-2. 부분 유전자의 결정	14

5. 면역유전자의 발현량 분석	17
5-1. 프라이머 제작	17
5-2. 면역유전자의 실시간 유전자 증폭(Real-time PCR) 실시	17
5-2-1. Internal control 유전자의 결정	18
6. 통계학적 분석	20
III. 결 과	21
1. 이리도바이러스 감염에 의한 누적폐사율의 측정	21
2. 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 클로닝	26
3. 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 부분 아미노산 서열의 특성	28
4. Internal control 유전자의 결정	31
5. 면역유전자 발현량 분석	33
5-1. 쏘가리 면역유전자의 basal level	33
5-2. 쏘가리 면역유전자의 발현 분석	36
5-2-1. IRF1	36
5-2-2. IRF2	36
5-2-3. IRF7	36
5-2-4. Mx protein	37
5-2-5. Viperin	37
5-2-6. 인터루킨 8	38
IV. 고 찰	51
V. 요 약	60
VI. 감사의 글	62
VII. 참고문헌	64

Characterization of the immune genes in korean mandarin fish
Siniperca scherzeri infected with megalocytivirus

Ki-won Shin

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), family *Iridoviridae*, genus *megalocytivirus* is causative agent of provoking high mortality of mandarin fish in China and have attracted more attention because of their ecological and economic impacts on wild and cultured fishes.

In this study korean mandarin fish *Siniperca scherzeri* which is same *Percichthyidae* family with chinese mandarin fish *Siniperca chuatsi* is used to investigate the pathogenicity of ISKNV-like megalocytivirus, named PGIV-1, isolated from pearl gourami in Korea after intraperitoneal challenge with analysis of the changed immune genes expression.

Cumulative mortalities of *S.scherzeri* challenged with three different density of PGIV-1 infected kidney of homogenates, $100\mu\text{g fish}^{-1}$, $10\mu\text{g fish}^{-1}$, $1\mu\text{g fish}^{-1}$ were calculated. No mortality is observed in challenged group with the lowest PGIV-1 density, $1\mu\text{g fish}^{-1}$ over 30 days as the control group injected with PBS. However, other two challenged groups, density of PGIV-1 $100\mu\text{g fish}^{-1}$ and $10\mu\text{g fish}^{-1}$ showed 100% mortality.

For cloning of immune genes, degenerated primer sets were designed after alignment with the corresponding genes of chinese mandarin fish for PCR amplification. After cloning of the target genes, amino acid sequences were also deduced and compared with those in *S.chuatsi* from china to determine the identity with each other.

Real-time PCR is performed to measure the expression level of the immune genes in *S.scherzeri* after various times of PGIV-1 challenge.

Expression of interleukin 8, IRF1, viperin and Mx genes were up-regulated significantly, which is contrast to the expression of IRF2 and IRF7 genes showing consistent expression.



I. 서론

Iridoviridea family 중 genus *megalocytyvirus*에 속하는 이리도바이러스는 최근 자연산 어류 뿐 아니라 양식산 어류에 미치는 생태적, 경제적 영향력 때문에 더욱 관심이 집중되고 있으며, 그 종류 또한 지속적으로 늘어나고 있다(Fu *et al.*, 2010). 발생하는 숙주의 범위도 다양하여 red sea bream *Pagrus major*(Inouye *et al.*, 1992), rock bream *Oplegnathus fasciatus*(Jung *et al.*, 2000), sea bass *Lateolabrax sp.*(Jung *et al.*, 1997) 등을 포함한 해산어 뿐 아니라 tilapia *Oreochromis niloticus*(Mcgrogan *et al.*, 1998), african lampeye *Aplocheilichthys normani*(Sudthongkong *et al.*, 2001), dwarf gourami *Colisa lalia*(Sudthongkong *et al.*, 2001) 등 담수어에서도 다양하게 보고되고 있다.

Infectious spleen and kidney necrosis virus(ISKNV)는 Iridoviridea family,의 genus *megalocytyvirus*로 분류되는 많은 이리도바이러스 중 하나이며 (Chinchar *et al.*, 2005), 중국의 mandarin fish *Siniperca chuatsi*에 감염 될 경우 폐사율이 높게 나타나 mandarin fish의 양식에 큰 피해를 주는 원인체이다(He *et al.*, 2002). Mandarin fish *S.chuatsi* 뿐만 아니라 다양한 담수어와 기수어에서 총 18 종류의 ISKNV-like viruses 검출이 보고된 바가 있고(Nakajima & Kurita, 2005), 중국 또는 태국에서 한국으로 수입되는 담수관상어인 필 구라미 *Trichogaster leerii*에서도 ISKNV-like virus(PGIV-1)의 검출이 보고된 바 있다(Jeong *et al.*, 2008).

우리나라에 서식하는 쏘가리 *Siniperca scherzeri*는 중국의 mandarin

fish *S.chuatsi*와 같은 과에 속하는 육식 어종으로 살아있는 먹이만을 섭식하는 습성 때문에 mandarin fish와는 달리 양식이 어렵고, 자연포획에 대부분 의존하고 있기 때문에 내수면 어종 중에서도 그 희소 가치가 높아 매우 고가로 취급되는 민물고기이다. Mandarin fish와는 달리 쏘가리의 경우 이리도바이러스에 의한 폐사가 현재까지 보고 된 바가 없지만, 해수에서 분리된 이리도바이러스를 담수어에 인위 감염시켰을 때(Dong *et al.*, 2010), 또는 담수에서 분리된 이리도바이러스를 해수어에 인위 감염시켰을 때도 병원성을 유지한 연구결과와 해수와 담수에서 분리된 이리도바이러스를 각각 담수와 해수에서 일정시간 배양 후 인위 감염시켰을 때도 그 병원성이 약화되거나 사라지지 않고 유지된다는 연구결과(Jeong *et al.*, 2008)로 미루어 볼 때, 이리도바이러스가 환경적 변화에 매우 안정적인 특징을 가진다는 것을 알 수 있다. 또한 ISKNV-like virus가 검출된 어종의 범위가 매우 넓다는 점을 미루어 보면 우리나라 쏘가리에서도 ISKNV-like virus의 감염이 나타날 수 있는 가능성이 매우 높다고 사료된다.

이에 우리나라 쏘가리 *S. scherzeri* 를 대상으로 우리나라로 수입된 담수관상어인 필 구라미 *T. leeri*에서 분리된 ISKNV-like virus인 PGIV-1(Jeong *et al.*, 2008)을 인위 감염시켜 그 감염 가능성을 확인하고자 하였다. 또한 바이러스의 농도를 달리하여 인위 감염시킨 후 농도별로 나타나는 폐사율의 차이를 분석하고자 하였다.

척추동물에 바이러스가 침입하였을 때 최초로 나타나는 방어기작은 선천적 면역반응으로 특히 인터페론, interferon-induced genes(ISGs)과 실질적인 세포성 면역기작의 매개로 활성화 된다(Verrier *et al.*, 2011). 바이러스에 감염된 척추동물에서 분비되는 대표적인 항 바이러스성 사이토카인인 인터페론은 바이러스 감염에 대한 숙주의 방어기작에 주된 역할

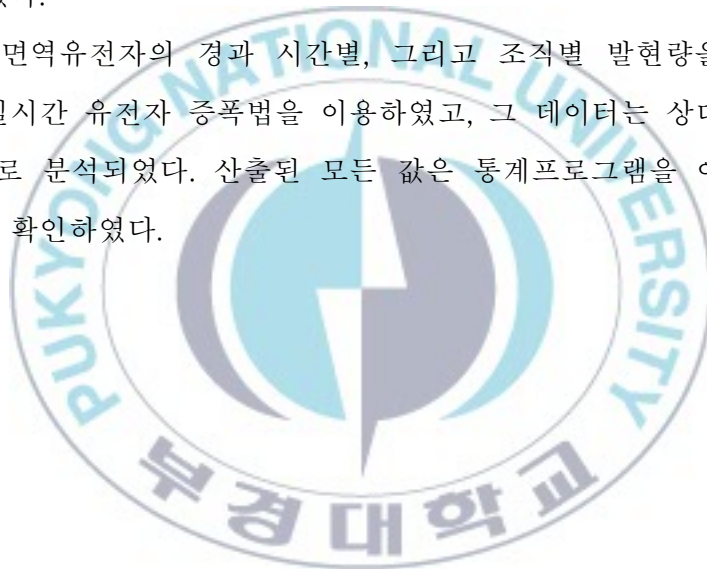
을 하는데(Børre Robertsen, 2006), 이러한 인터페론의 자극에 의해 나타나는 항 바이러스성 유전자인 ISGs는 현재까지 포유류에서만 200가지 이상의 종류가 밝혀져 있다(Der *et al.*, 1998 ; Welsh and Sen, 1997).

많은 ISGs 중에서 몇몇은 인터페론의 반응기로 작용하는 반면, 어떤 종류는 항바이러스 작용을 가진다고 보고된 바 있다. 그러나 대부분의 몇몇 어류에서만 그 작용에 대해 보고되었을 뿐 대체적으로 어류의 ISGs에 대한 정보가 부족한 실정이다(Verrier *et al.*, 2011; Volff, 2005). 경골어류에서 발견된 ISGs에는 viral hemorrhagic septicemia (VHS)에 감염된 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*(Boudinot *et al.*, 1999; O'Farrell *et al.*, 2002)와 mandarin fish *Siniperca scherzeri*에서 그 발현이 보고되어진 vig1/viperin(Chen *et al.*, 2010)과 무지개송어를 비롯한 여러 경골어류에서 발현하는 Mx protein(Trobridge and Leong, 1995), poly I:C stimulation 또는 바이러스에 노출시켰을 경우 각각 atlantic cod와 mandarin fish에서 그 발현이 보고된 interferon regulatory factor family 등이 대표적이다(Rise *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007). 각 ISGs의 특징을 간단히 기술하면 IRF family의 경우 인터페론의 신호 전달과 감지에 관여하고, viperin과 Mx protein은 세포내에서 분비가 되는 항 바이러스성 단백질이다. 이와 달리 인터루킨 8의 경우 척추동물의 비특이적 면역반응에 관여하는데, 호중구를 염증부위로 이동시키는 pro-inflammatory chemokine으로 바이러스, 세균 및 TNF- α 또는 인터루킨 1 β 에 의해 발현양이 증가한다고 밝혀져 있다(Abdelkhalek *et al.*, 2009).

ISGs에 속하는 IRF family, viperin, Mx protein과 비특이적 면역에 관여하는 인터루킨 8은 그 활성기작과 역할에 차이가 있지만 바이러스 감염시 경골어류에서 발현되는 면역유전자라는 공통적인 특징을 지닌다.

본 연구에서는 ISGs와 인터루킨 8 등의 면역유전자가 우리나라 쏘가리에서 어떻게 발현되는지 알아보기 위하여 쏘가리의 면역유전자를 클로닝 하였고, 쏘가리에 이리도바이러스를 인위 감염 시켜 그 발현 특징을 분석하였다. Mandarin fish에서 클로닝 된 면역유전자의 부분 또는 전체 cDNA 염기서열로부터 재조합한 프라이머를 제작하여 쏘가리의 면역유전자를 클로닝 하였고, 염기서열 분석을 통해 쏘가리에서 발현되는 면역유전자를 분석하여 mandarin fish의 것과 어느 정도 차이가 나타나는지 비교 하였다.

더불어 면역유전자의 경과 시간별, 그리고 조직별 발현량을 측정하기 위해서 실시간 유전자 증폭법을 이용하였고, 그 데이터는 상대적 mRNA 발현량으로 분석되었다. 산출된 모든 값은 통계프로그램을 이용하여 그 유효성을 확인하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어

외관상으로 건강해 보이는 1년생 쏘가리 *Siniperca scherzeri* 치어(어체 중 $7.6 \pm 3g$)를 $25 \sim 26^{\circ}C$ 수온의 0.2톤 수조에서 일주일 이상 순치시킨 뒤 실험에 사용하였다. 먹이는 하루에 한번 쏘가리 치어 1마리가 1~2마리의 물고기 치어를 섭식할 수 있는 양을 주었고, 순치된 쏘가리 치어는 실험에 따라 10~30마리 씩 80리터 사각 유리 수조에 수용되었고, 은닉성 어류임을 감안하여 외부적인 스트레스를 줄이기 위해 수조의 벽면을 가리고, 수조 내에 각각 PVC 파이프 2~3개를 넣어주었다.

실험 전 쏘가리 치어의 이리도바이러스 감염 여부를 확인하기 위하여 비장 및 신장 조직을 적출하여 DNA를 분리 한 후, 종 특이적인 프라이머를 사용해 primary PCR 과 nested PCR을 실시하여 iridovirus-free 상태임을 확인하였다(Fig 1, Table 1).

2. 바이러스 공격 실험

2-1. 바이러스

바이러스는 펄 구라미 *Trichogaster leeri*에서 분리된 ISKNV-like strain인 PGIV-1(Jeong *et al.*, 2003)을 사용하였다. PGIV-1에 감염되어

세포변성효과(CPE)가 나타난 cell line의 상정액을 어체중 16~17g 정도 되는 쏘가리에 복강 주사로 인위 감염시켜 폐사한 폐사체의 신장 조직을 적출하여 본 연구의 공격실험에 사용하였다. 폐사체에서 이리도바이러스 감염여부를 확인하기 위해 이리도바이러스의 MCP부위에서 제작한 특이적인 프라이머(Table 1)를 사용하여 PCR을 실시하고, 그 증폭산물을 전기영동을 통해 확인하였다.

PGIV-1 감염 폐사체로부터 적출한 신장은 사용하기 전까지 -80°C (Thermo scientific FORMA 900 series, USA)에 보관하였다.

2-2. Viral DNA의 분리

이리도바이러스 감염확인을 위해 쏘가리의 비장 및 신장 조직에서 이리도바이러스의 viral DNA를 분리하였다. Viral DNA의 분리에는 상업적으로 시판되는 DNesy[®] Blood & Tissue Kit(QIAZEN)을 사용하여 제조사의 상업적 설명서에 따라 분리를 실시하였고, elution 단계에서 최종 volume이 $50\mu\text{l}$ 가 되도록 total nucleic acid를 분리하여 사용 전까지 -20°C 에서 보관하였다.

2-3. PCR(Polymerase chain reaction)증폭

실험에 앞서 쏘가리 치어에서의 이리도바이러스의 임상적 감염 여부에 대하여 확인하기 위해 이리도바이러스의 ORF-2 부위에서 특이적으로 제작한 프라이머를 이용하여 Primary PCR 과 Nested PCR을 실시하였

다. 공격 실험 후 발생한 폐사체의 이리도바이러스 감염확인에는 이리도 바이러스의 MCP 부위에서 제작된 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다(Table 1).

2-3-1. Primary PCR 증폭

PCR 증폭은 Dyad Disciple peltier Thermal Cycler(Bio-RAD, USA)를 사용하여 실시하였다. Primary PCR은 0.2ml 마이크로튜브에 0.5 μ l 의 genomic DNA, 10 mM Tris - HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%(w/v) gelatin, 0.5%Tween-20, dNTP 각각 200 μ M, 1 μ M 의 primary PCR 프라이머(Table 1)가 각각 포함되었고, 1.25U의 AmpliTaq[®]DNA Polymerase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)가 포함된 reaction mixture 50 μ l를 기준으로 제작하였다. PCR condition으로는 initial denaturation 과정을 95°C에서 3분 거치고, denaturation 과정을 94°C 에서 30초, annealing 과정을 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서30초 간 extension 과정까지 1cycle로 하여 총 30cycles 돌린 후, final extension 과정을 72°C에서 7분간 거쳤다. PCR 후 증폭 산물은 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 사용하여 0.5 μ g/ μ l EtBr (Ethidium Bromide)이 첨가된 1% agarose gel(Agarose-Molecular Biology grade, Invitrogen, USA)상에서 전기 영동한 후, gel documentation system(AlphaImager[®] HP, MultiImager[®] II, Alpha Innotech)을 이용하여, 전기영동 상에서 검출되는 band의 길이를 확인하였다.

2-3-2. Nested PCR 증폭

Nested PCR 증폭의 경우 primary PCR 증폭 산물 $0.5\mu\text{l}$ 를 취하여, template으로 사용하고 여기에 특이적으로 결합하도록 제작된 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 primary PCR 증폭 과정과 동일하게 실시했다. 증폭된 산물을 1% agarose gel 전기영동을 통해 분석하였고, primary PCR의 증폭 산물과 동일한 방법으로 관찰하였다.

2-4. 주사액의 준비

쏘가리 치어에 이리도바이러스를 인위감염 시키기 위한 주사액은 PGIV-1을 복강 주사하여 인위감염 시킨 쏘가리의 신장 조직을 이용하여 제작하였다. PGIV-1에 감염되어 폐사한 쏘가리에서 신장을 적출한 후, phosphate buffered saline(PBS, 0.1M, pH7.2)와 함께 1.5ml 마이크로 튜브에 넣고, pestle(Sigma-Aldrich, USA)을 이용해 균질화 한 뒤 $3000\times g$ 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상정액은 $0.45\mu\text{m}$ membrane을 이용하여 필터 멸균하였고, $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여 사용하기 전까지 -80°C (Thermo scientific FORMA 900 series, USA)에서 보관하였다.

2-5. 공격 실험

2-5-1. 면역유전자의 발현 변화 측정을 위한 공격 실험

이리도바이러스에 감염되지 않은 쏘가리 치어 30마리에 어체 당

PGIV-1 감염 신장조직 1mg을 복강주사 한 뒤(1mg fish^{-1}), 80리터 수조에 수용하면서 수온을 $25\sim 26^{\circ}\text{C}$ 로 유지했고, 환수는 4 ~ 5일에 한번 씩 실시하였다. 대조군로는 쏘가리 치어에 phosphate buffered saline (PBS; 0.1M, pH7.2)을 0.1ml씩 복강 주사한 것을 사용했고, 수조 및 수온의 조건을 동일하게 했다. 위와 동일한 조건의 실험 군을 각각 이단반복 하였다.

2-5-2. 바이러스 농도별 누적폐사율 측정을 위한 공격 실험

바이러스 농도에 따른 폐사의 변화를 측정하기 위해 PGIV-1에 감염된 신장 조직의 양을 달리하여 공격 실험을 실시하였다. 총 3개의 그룹으로 나누었으며, 그룹별로 PGIV-1 감염 신장조직을 각각 $100\mu\text{g fish}^{-1}$, $10\mu\text{g fish}^{-1}$, $1\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 양으로 복강 주사하였다. 그룹별로 쏘가리 치어 10마리 씩 수용되었고, 수조 및 수온 조건은 위와 동일하게 주어졌다. 복강 주사된 주사액별로 viral DNA를 분리한 뒤 PCR 증폭을 하여 band를 확인하였다.

3. 누적 폐사율의 측정

실험이 진행되는 동안 발생한 모든 폐사체는 매일 수집되었고, 폐사체로부터 신장과 비장을 분리한 뒤 viral DNA를 분리하였다. 이리도바이러스의 감염여부는 PCR 증폭을 통해 확인하였다.

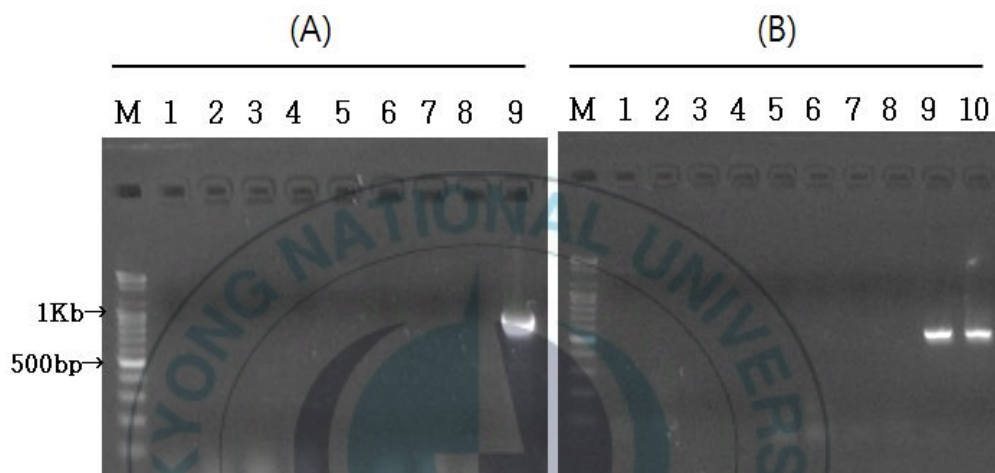


Fig 1. PCR to the total DNA from korean mandarin fish *Siniperca scherzeri* used in this study as healthy fish with the primer sets specific to ORF-2 gene of PGIV-1. (A) Primary PCR with KE1F/KE1R and (B) Nested PCR with KE2F/KE2R. Iridovirus positive control(Lanes 9, 10); M:100bp ladder

Genomic region	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size	Object	Reference
ORF-2	KE1F	AAATGGCTCTTTGGAGTGTC	939bp	Detection of iridovirus in live <i>S.scherzeri</i>	Jeong <i>et al.</i> (2003)
	KE1R	AATCCATCGGTATTATG			
	KE2F	GGGTCGCCTGGTATGTAC	554bp		
	KE2R	CATCGAGGCACTCTTCGC			
MCP	M5F	CTGCGCATGCCAATCATC		Detection of iridovirus in dead <i>S.scherzeri</i>	In this study
	M5R	GCGATGGAGACCCACTTG			

Table 1. Primers used in this study.

4. 면역유전자 발현의 측정

4-1. 바이러스 공격 후 0, 1, 4, 10일째 시료채취 실시

PGIV-1 공격 실험을 한 뒤 0일째, 1일째, 4일째, 10일째에 면역유전자의 발현량을 측정하기 위해 시료채취를 실시하였다. 바이러스 공격하기 전의 개체를 3마리 시료채취 하여 0일째 시료로 설정하였고, 1, 4, 10일째에는 PGIV-1 공격그룹과 PBS를 복강 주사한 대조군에서 각각 3마리씩 시료를 채취 하였다. 시료채취 된 개체를 MS-222 200ppm에서 마취시킨 뒤, 신장, 비장, 간을 각각 분리하였다. 분리된 신장, 비장, 간은 RANlater™ (RNA Stabilization Reagent, QIAGEN, Germany)에 4℃에 1일, -20℃에 1일 동안 반응시킨 뒤 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

4-2. Total RNA 분리

RANlater™ (RNA Stabilization Reagent, QIAZEN)에서 사용 전까지 보관했던 각 그룹의 신장, 비장, 간으로 부터 total RNA를 분리하기 위해 상업적으로 시판되는 RNeasy® Mini Kit(QIAGEN, Germany)를 사용하였다.

각 장기가 들어있는 1.5ml 마이크로튜브에 β -mercaptoethanol이 포함된 Lysis buffer를 넣고, pestle(Sigma-Aldrich, USA)을 이용해 균질화 시

킨 다음, 상업적 설명서에 따라 분리하였고, 최종 elution volume은 20~30 μ l이 되도록 하였다.

4-3. RT-PCR 실시

분리한 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 상업적으로 시판되는 SuperScript™ II Reverse Transcriptase(invitrogen, USA)을 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 0.2ml 마이크로튜브에 total RNA 1 μ g, 각각 10mM 농도의 dNTs 1 μ l, random 프라이머 1 μ l, DEPC water를 넣고, 65℃에서 5분간 반응시킨 후, 5X First-Strand Buffer 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l를 넣고, 25℃에서 2분간 반응시켰다. 최종적으로 SuperScript™ II Reverse Transcriptase(invitrogen, USA) 0.5 μ l를 넣고, 42℃에서 50분, 75℃에서 15분간 반응시킨 후, 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

4-4. 클로닝

4-4-1. Degenerated 프라이머 제작 및 PCR 증폭

쏘가리에서 발현하는 면역유전자를 클로닝하기 위해 Gene bank에 등록되어 있는 mandarin fish *Siniperca chuatsi*의 면역유전자의 전체 또는 부분 ORF 부위(Table 2)로부터 degenerated 프라이머를 제작하고, PCR을 실시하였다(Table 3).

PCR을 통해 증폭된 산물을 전기 영동하여 band를 확인하고, 그 band

를 분리하기 위해 elution 과정을 거쳤다. Elution과정에서 상업적으로 시판되는 Expin Gel SV(Gene All, South Korea)를 사용하였고, 분리는 상업적 설명서에 따라 실시하였다.

4-4-2. 부분 유전자의 결정

Degenerated 프라이머를 제작하여 PCR 증폭한 뒤 증폭된 산물을 elution 후 sequencing을 하였다. Sequencing 후 DNA 염기서열의 길이가 Real-time을 위한 프라이머 제작에 충분하지 않은 경우 RACE-PCR을 실시하였다. RACE-PCR에는 CapFishing™ Full-length cDNA Premix Kit(Seegene, USA)를 사용하였다. 상업적 방법에 따라 프라이머 (Table 3)를 제작한 뒤 RACE-PCR을 실시하고, 그 산물을 elution한 뒤 sequencing하고 면역유전자의 부분 유전자를 최종적으로 결정하였다.

Immune genes	Amino acid	Source	GeneBank accession no.	Reference
IRF1	301	<i>S.chuatsi</i>	AAV65042.1	Sun <i>et al.</i> (2007)
IRF2	291		ABJ09546.1	Sun <i>et al.</i> (2006)
IRF7	433		AAV65045.1	Sun <i>et al.</i> (2007)
Mx protein	626		AAQ91382.1	Unpublished
IL-8	113		AAV79282.2	Unpublished
Beta actin	176		AAW77932.1	Unpublished
GAPDH	335		ADH 43627	Unpublished
13s rRNA	106		AAV79230.1	Unpublished
Viperin	347	<i>S.scherzeri</i>	ABO48456.1	Unpublished

Table 2. Complete or partial ORF sequences of immune genes express in mandarin fish *Siniperca chuatsi* for designing degenerated primers to analysis partial genome sequences of korean mandarin fish *Siniperca scherzeri*

Immune genes	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Object	Reference
IRF1	KmIRF 1F	AATGGGCCATCCACACA	Cloning	In this study
	KmIRF 1R	TTCACTCCACTGGCTCCCTG		
IRF2	KmIRF 2F	CTGGGACCTGGAGAAAGATG	Cloning	
	KmIRF 2R	CCCGGTCCCATGTAATAAC		
IRF7	IRF2-3GSP	GCTCCGCTCTTCATGAGATGGG	3' RACE	
	KmIRF 7F	ATTCCGGGCATGGGCAGTAG	Cloning	
	KmIRF7R	GGCAGCTTTCTTGGGTCT		
Mx protein	KmMx F	ACGGCCTTCACTCAGGATGC	Cloning	
	KmMx R	GGTATGCTCGGGCCTCA		
Beta actin	KmB 1F	CCACAGCCGAGAGGGAATC	Cloning	
	KmB 1R	TGGAAGGTGGACAGAGAG		
		Ba-3GSP	CTGGACTTCGAGCAGGAGATGG	

Table 3. Primers used for cloning of immune genes express in korean mandarin fish(*Siniperca scherzeri*).

5. 면역유전자의 발현량 분석

5-1. 프라이머 제작

PCR증폭 및 RACE-PCR에서 얻은 쏘가리의 면역유전자의 부분 유전자 으로부터 Real-time PCR용 프라이머 세트를 제작하였다. 프라이머 세트 제작에는 Primer express 3.0 프로그램을 사용했다(Table 4).

5-2. 면역유전자의 실시간 유전자 증폭(Real-time PCR) 실시

0, 1, 4, 10일째에 각각 3마리씩 시료 채취한 쏘가리의 신장, 비장, 간에서 total RNA를 분리하고, 이를 이용해 cDNA를 합성하여 면역유전자 발현량 측정을 위한 real-time PCR 증폭의 template으로 사용했다.

Real-time PCR 증폭에는 QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit와 7500 Real time PCR System (Applied Biosystem, USA)을 사용하였다. 총 volume 25 μ l의 mixture에는 HotStarTaq[®] DNA polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR buffer(Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, pH8.7), dNTP mix, SYBR Green 1 dye, 10pmol 프라이머(Table 4) 각각 1 μ l, 1 μ g의 cDNA, DEPC water가 포함되었다. Real-time PCR 증폭은 Holding stage에서 95 $^{\circ}$ C, 10분간 반응한 후에 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 55 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C, 33초간 반응하였고, 이를 40cycles 반복하였다. Melting curve stage는 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 6

0℃에서 15초로 설정하여 melting curve를 측정하였다. Real-time PCR 1회运行时 96well PCR plate에는 0, 1, 4, 10일째 채취한 시료의 cDNA가 1개의 plate내에 모두 포함되도록 설정하였고, 면역유전자 및 장기별로 plate를 구분지어서 real-time PCR을 실시하였다. 채취한 쏘가리 3마리의 장기에서 각각 합성된 3개의 cDNA를 1 μ l씩 덜어내어 균질하게 섞은 다음, 그것을 real-time PCR에 사용할 template으로 사용하였다. 대조군은 PGIV-1 그룹과 동일하게 시료채취 날짜별로 real-time PCR 증폭하였다. Internal control 유전자에 대한 각 면역유전자 mRNA의 상대적 발현량을 계산하기 위하여 0일째 시료 채취한 쏘가리 그룹을 reference sample로 설정하고, 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method를 사용하여 데이터 값을 산출했다.

5-2-1. Internal control 유전자의 결정

일반적으로 널리 사용되는 endogenous gene들을 비교하고, 본 연구에 사용할 유전자를 결정하기 위하여 mandarin fish의 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), 13sRNA, beta actin의 유전자로부터 프라이머를 제작하여, real-time PCR을 실시하였다. 프라이머 제작에는 primer express 3.0을 사용하였다(Table 4).

Real-time PCR 증폭시 template으로는 쏘가리 치어의 Liver에서 분리한 total RNA를 사용하여 합성한 cDNA를 사용하였다. Real-time PCR condition은 위에 기술한 것과 동일하게 실시하였다.

Immune gene	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Source	Reference
IRF1	RT-IRF1 F	CAGAGCAGCAAGATTTCCCATT	<i>S.scherzeri</i>	In this study
	RT-IRF1 R	CCCCGATCTCAACTGACAAAG		
IRF2	RT-IRF2 F	TGAAGTGACCACAGAGAACGAAGA		
	RT-IRF2 R	GAAGACACGGGAGAGATTTGGA		
IRF7	RT-IRF7 F	CTGACAAGGCCAGGTGGAA		
	RT-IRF7 R	TTCTATCATCTTGAAGCGCACGTA		
Mx protein	RT-Mx F	AGATCCCACTGGTGATCCGCTAC		
	RT-Mx R	AAGCACCTGCATCATCTCCC		
IL-8	RT-IL8 F	TGGAGATTGTTGTACCCCTAAAGA		
	RT-IL8 R	GAGGTTTTCTGTTTGATGATGTTAGC		
Viperin	RT-Vip F	TCCAGTGTCTGCTGATTGACG		
	RT-Vip R	ATGACGAACCTCTCTGCCTCTC		
Beta actin	RT-actin F	GCTCCATCCTGGCCTCTCTGT		
	RT-actin R	GGGCCGGACTCATCGTACTC		
GAPDH	RT-GAP F	CCTCCTGCACCACCAACTG		
	RT-GAP R	GAGCCTCCTCAATGCCAAAG		
13S rRNA	RT-13S F	CCCTCTCAGATTGGTGTGATTC		
	RT-13S R	AGGATCTTGTGTCAGTGACG		

Table 4. Primers used for real-time PCR to analysis the relative immune genes expression level.

6. 통계학적 분석

Real-time PCR 증폭을 통해 측정된 데이터로부터 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method를 이용하여 면역유전자 mRNA의 상대적 발현량을 산출한 다음, 각 결과에서 나타나는 값의 차이에 대한 유효성을 증명하기 위해 통계학적 분석을 실시하였다. 통계 프로그램에는 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences)를 사용하였다. PBS와 PGIV-1를 복강 주사한 그룹간의 데이터 차이에 대한 유효성 증명을 위해서는 T-test를 사용했고, 시료채취 시기별 데이터 분석에는 Duncan's multiple range test에 의한 one-way ANOVA 방식을 사용하였다. 데이터 값의 차이가 유효한 경우($P < 0.05$) 기호 및 문자로 표시하였다.



III. 결 과

1. 이리도바이러스 감염에 의한 누적폐사율의 측정

이리도바이러스 농도에 따른 쏘가리의 누적폐사율 차이를 알아보기 위해 PGIV-1에 감염된 쏘가리 신장조직의 양을 달리하여 쏘가리 치어에 복강 주사하였다. 면역유전자의 발현량 변화를 측정하기 위한 실험군을 포함하여 총 4개의 실험군으로 나누어 측정하였는데, 실험군별로 어체 당 1mg, 100 μ g, 10 μ g, 1 μ g의 PGIV-1 감염조직을 마쇄하여 복강 주사하였고, 대조군에는 PBS를 복강 주사하였다.

면역유전자의 발현량 변화 측정을 위해 PGIV-1 감염조직을 어체 당 1 mg의 농도로 복강 주사한 실험군의 경우 이단 반복하여 실시하였다. 그 결과 이단 반복한 실험군들 모두 거의 유사한 시기인 10일~11일부터 폐사가 나타나기 시작하여 13일~14일 정도 지나자 폐사율이 60 %이상으로 나타났고, 17일~19일째 되는 시기에 100 % 폐사하였다(Fig2).

PGIV-1 감염조직의 양을 달리하여 복강 주사하였을 때 누적 폐사율에 어떤 변화가 생기는지 알아보기 위해 마쇄한 PGIV-1 감염조직을 각각 어체 당 100 μ g, 10 μ g, 1 μ g의 양으로 주입되도록 PBS를 이용해 단계 희석한 후 쏘가리 치어 10마리에 복강 주사하였다. 단계 희석한 감염조직 마쇄액에서 viral DNA를 분리한 뒤 PCR 증폭(Table 1)을 하여 전기 영동 상에서 나타나는 농도 차이를 육안으로 확인하였다(Fig 3).

어체 당 100 μ g와 10 μ g의 PGIV-1 감염조직을 복강 주사한 실험군의 경우 어체 당 1 mg의 감염조직을 복강 주사한 실험군과 유사하게 주입 후

11~12일째 되는 시기부터 폐사가 나타나기 시작하였다. 반면 어체 당 감염조직 100 μ g과 10 μ g을 복강 주사한 실험군의 경우 폐사가 나타나기 시작한 시점은 어체 당 1mg의 감염조직을 복강 주사한 실험군과 유사했으나, 100 % 폐사에 도달하기까지 소요되는 시간이 더 오래 걸렸다.

또한 어체 당 PGIV-1 감염조직 10 μ g을 복강 주사한 실험군의 경우 이보다 PGIV-1 감염조직의 양이 10배 많은 어체 당 100 μ g을 복강 주사한 실험군에 비해 폐사가 더 천천히 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. 가장 적은 양인 어체 당 1 μ g의 PGIV-1 감염조직을 복강 주사한 실험군의 경우 PBS를 복강 주사한 대조군과 동일하게 30일 이상 폐사가 나타나지 않는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig 4).

바이러스에 의한 폐사여부를 확인하기 위하여 폐사한 쏘가리 치어의 신장과 비장을 적출하여, viral DNA를 분리한 뒤 PCR을 실시하였고, PGIV-1의 감염에 의해 폐사한 것을 전기영동 상에서 확인 할 수 있었다.

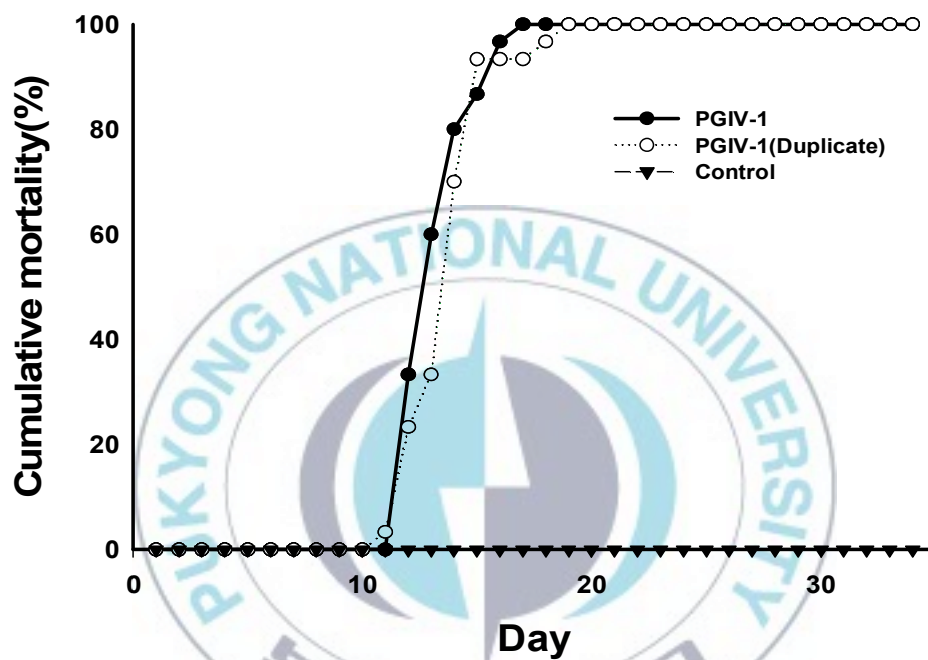


Fig 2. Cumulative mortality of Korean mandarin fish juvenile *Siniperca scherzeri* after i.p injected with homogenate of PGIV-1 infected kidney (1mg fish⁻¹).

●, ○: PGIV-1 challenged groups (Duplicated); ▼: Control group



Fig 3. 1.5% agarose gel electrophoresis of 3 different density of PGIV-1 infected kidney homogenate.

Lane 1: 1mg ml^{-1} ; Lane 2: $100\mu\text{g ml}^{-1}$; Lane 3: $10\mu\text{g ml}^{-1}$; Lane 4: Positive control; Lane 5: Negative control ; Lane M: 100bp DNA ladder

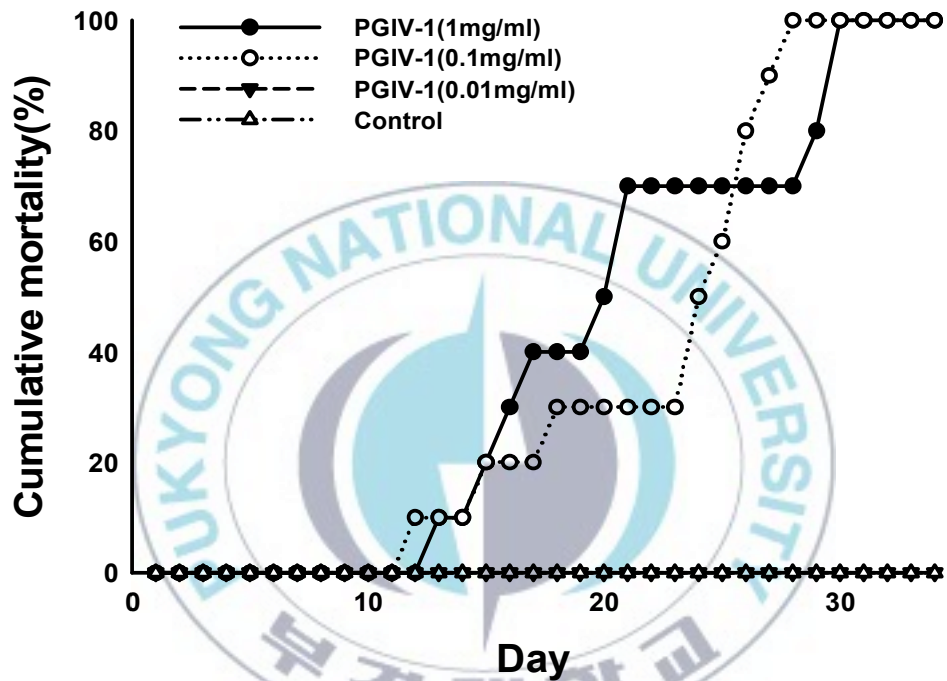


Fig 4. Cumulative mortalities in 3 different groups i.p injected with 3 different densities of PGIV-1 infected kidney homogenate.

2. 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 클로닝

mandarin fish *Siniperca chuatsi*의 면역유전자의 부분 또는 전체 cDNA 염기서열을 바탕으로 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 부분 cDNA를 클로닝 하였다. 면역유전자를 클로닝하기 위해 mandarin fish에서 나타나는 Interferon regulatory factor 1(IRF1), Interferon regulatory factor 2(IRF2), Interferon regulatory factor 7(IRF7), Interferon induced protein인 Mx protein의 cDNA 염기서열로부터 degenerated 프라이머를 제작하여 PCR을 실시하였다. PCR 증폭 후 전기영동 상에서 band를 확인하고, 그 band를 elution하여 direct sequencing을 실시하였다. Direct sequencing 결과는 blasting을 통해 해당 면역유전자가 맞는지 확인하였다. Blasting을 통해 확인이 된 쏘가리의 면역유전자는 real-time PCR에 사용 할 프라이머를 제작하는데 사용하였고, 그 중 Interferon ragulatory factor 2는 RACE-PCR과정을 거친 뒤 생성된 cDNA 염기서열을 사용해 real-time용 프라이머를 제작하였다.

클로닝한 쏘가리의 면역유전자의 cDNA의 길이는 각각 IRF1이 267bp, IRF2 579bp, IRF7 831bp, Mx protein 201bp였다. 클로닝된 cDNA 염기서열은 GeneBank에 쏘가리의 부분 cDNA로 각각 등록하였다(Table 5).

Table 5. Accession numbers of registered partial genomes of immune genes express in korean mandarin fish *S.scherzeri*.

Immune genes	Amino acid	GeneBnak Accession No.	Organism
IRF1	89	JN859505	<i>S.scherzeri</i>
IRF2	193	JN859506	
IRF7	276	JN859507	
Mx protein	66	JN859508	
Beta actin	131	JN859504	

3. 쏘가리에서 발현되는 면역유전자의 부분 아미노산 서열의 특성

쏘가리 *S.scherzeri*에서 발현되는 IRF1, IRF2, IRF7, Mx protein을 클로닝한 뒤 아미노산 서열을 결정하였다. 결정된 쏘가리의 면역유전자의 아미노산 서열은 mandarin fish *S.cuatsi*의 것과 비교하여 그 차이를 분석하였다(Fig 5).

쏘가리에서 발현되는 IRF1은 mandarin fish에서 발현되는 IRF1의 153번째부터 261번째의 아미노산과 일치하였다. 그 중에서 쏘가리의 아미노산은 mandarin fish의 158~130번째, 176번째 아미노산과 차이가 났다.

IRF2는 mandarin fish의 176번째, 237번째의 아미노산 서열을 제외한 46~238번째 아미노산과 일치하였다. IRF7는 mandarin fish의 30~306번째 아미노산과 일치했다. 클로닝한 면역유전자 중에서 쏘가리의 것과 가장 많은 차이를 보였는데, mandarin fish의 35~39번째, 211번째, 300~305번째 아미노산서열에서 차이가 나타났다. Mx protein의 경우 mandarin fish의 544~610번째까지의 아미노산서열과 일치했지만, 545번째의 아미노산이 쏘가리에서는 삭제된 것을 관찰하였고, 각각 547, 577, 608~609번째 아미노산과 차이를 보였다.

IRF1

S.scherzeri GSTPGASLSTQENTVDSTVHTEQDFFPVAPSDVPDWSLSVEIGAESLLNNICHRFEVSP
S.chuatsi 153 GSMPEDTLSTQENTVDSTVHTEHQDFFPVAPSDVPDWSLSVEIGAESLLNNICHRFEVSP 212

S.Scherzeri EHSPDHDYTDIIQICQQLKDSHWMSSS
S.chuatsi 213 EHSPDHDYTDIIQICQQLKDSHWMSSS 241

IRF2

S.scherzeri WDLEKDAPLFMRWAIHTGKYQPGIDRPDKTWKANFRCAMNSLPDIEEVKDKSIKKGTNA
S.chuatsi 46 WDLEKDAPLFMRWAIHTGKYQPGIDRPDKTWKANFRCAMNSLPDIEEVKDKSIKKGTNA 105

S.Scherzeri FRVYKMLSSSERSMKKGKKKTDKEGRPKGNKEVASPSPDRTPSDAPVGPIDFTKQEVIKQ
S.chuatsi 106 FRVYKMLSSSERSMKKGKKKTDKEGRPKGNKEVASPSPDRTPSDAPVGPIDFTKQEVIKQ 165

S.Scherzeri ETVELTVMDASAIHSSVEDHVITSEQLPFVCQTIEVTTENEEQTVSSSHSYPLQISPVS
S.chuatsi 166 ETVELTVMDNASAIHSSVEDHVITSEQLPFVCQTIEVTTENEEQTVSSSHSYPLQISPVS 225

S.Scherzeri SCCGETTHTCSTHT
S.chuatsi 226 SCCGETTHTHAHT 238

IRF7

S.Scherzeri FRVQWSTTPERTALEEDSKIIFRAWAVASGKINEFPDTPDKARWKTNFRCALNNLYVRFKMIE
S.chuatsi 30 FRVPWKHNSRKDCNEEDSKIIFRAWAVASGKINEFPDTPDKARWKTNFRCALNNLYVRFKMIE 89

S.Scherzeri DNSKNSDDPHKIYEIINTEYNYECQPTQDSQEDSKMAPDIYRNICFPSPGNEHNNLNFM
S.chuatsi 90 DNSKNSDDPHKIYEIINTEYNYECQPTQDSQEDSKMAPDIYRNICFPSPGNEHNNLNFM 149

S.Scherzeri ALDLGNHPSEEQPAENFGQHKSAVFESYPLAEDHPQLLPDQTSYYEVNPQPVLSPLQ
S.chuatsi 150 ALDLGNHPSEEQPAENFGQHKSAVFESYPLAEDHPQLLPDQTSYYEVNPQPVLSPLQ 209

S.Scherzeri PSIIDLEISIHRYKRQMLKTTLHTARIQLHYLLEAPELSAHHICFPSTDGLLDHKQIDFT
S.chuatsi 210 PCIYDLEISIHRYKRQMLKTTLHTARIQLHYLLEAPELSAHHICFPSTDGLLDHKQVDFT 269

S.Scherzeri NRVLNSIQKGLLLEVRETGIYAWRQDRCHVLPAPHPNP
S.chuatsi 270 NRVLNSIQKGLLLEVRETGIYAWRQDRCHVFASTSDP 306

Fig 5. Continued

Mx

```
S.Scherzeri      M*H#KSYKIASQRLADQIPLVIRYQMLQESAVQLHREMMQVLQDKENLEFLKEDSDIG
S.chuatsi      544 MLHLKSYKIASQRLADQIPLVIRYQMLQESASQLHREMMQVLQDKENLEFLKEDSDIG 603

S.scherzeri      SKRAAAE
S.chuatsi      604 SKRAALQ 610
```

Fig 5. Deduced ISGs amino acid sequences in korean mandarin fish *Siniperca scherzeri* and chinese mandarin fish *Siniperca chuatsi*. Different amino acids in korean mandarin fish are marked with grey color.



4. Internal control 유전자의 결정

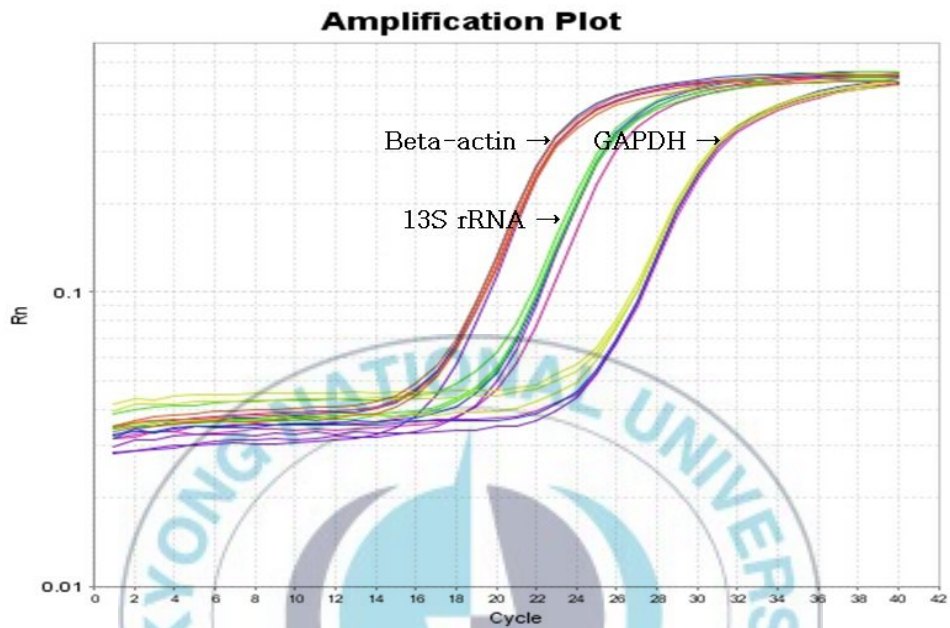
쏘가리 면역유전자의 상대적 발현량을 산출하기 위하여 endogenous gene을 결정하였다. Housekeeping genes 중에서 beta-actin, GAPDH, 13S ribosomal RNA를 선택하였고, 이들 중 하나를 선택하기 위하여 mandarin fish의 beta-actin, GAPDH, 13S ribosomal RNA 유전자 (Table 2)로부터 real-time용 프라이머 세트(Table5)를 제작하고, 이를 이용하여 쏘가리의 beta-actin, GAPDH, 13S ribosomal RNA 유전자를 실시간으로 증폭하여 그 유효성을 측정하였다.

정상 쏘가리의 간으로부터 분리한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 이것을 template으로 사용하여 각 primers 별로 3단 반복하여 real-time PCR을 실시했다.

Real-time PCR한 결과 C_T 값의 크기가 beta-actin, 13S ribosomal RNA, GAPDH 순서로 측정되었다. Beta-actin의 발현이 18cycles부터 제일 먼저 나타났고, GAPDH가 24 cycles부터 발현이 나타났다. Real-time PCR 마지막 단계에서 melting point를 측정하여 제작된 프라이머에 이상이 없음을 확인하였다.

C_T 값과 melting curve, 3단 반복한 시료 사이의 variation 등을 고려하여 최종적으로 사용할 internal control gene으로 beta-actin을 선택하였다(Fig 6).

(a)



(b)

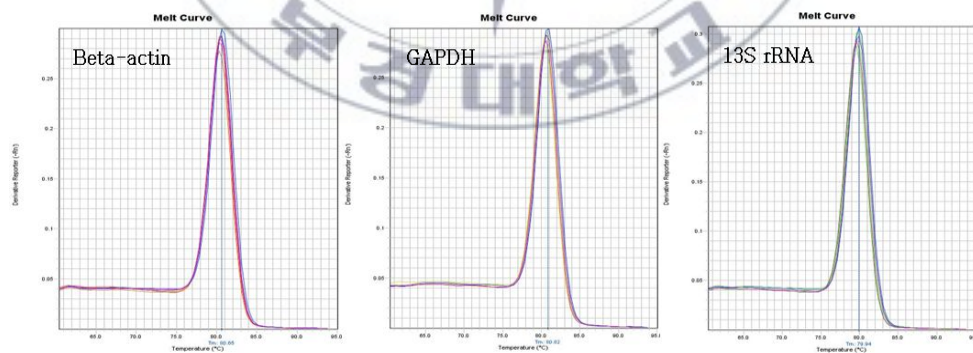


Fig 6. Determination of internal control for analysis of relative immune gene expression in *S.scherzeri*. (A) Amplification plots of three internal control genes. (B) Melting curves of each endogenous genes.

5. 면역유전자 발현량 분석

5-1. 쏘가리 면역유전자의 basal level

이리도바이러스에 감염되기 전의 쏘가리에서는 일반적으로 어느 정도의 면역유전자가 발현되어있는지를 알아보기 위해 쏘가리의 신장, 비장, 간에서 total RNA를 분리하여 cDNA합성한 다음, real-time PCR을 실시하고, normal 쏘가리의 면역유전자 C_T 값과 internal control C_T 값의 차이인 ΔC_T 값을 산출하여 면역유전자의 발현 정도를 조직별로 비교하였다 (Table 6, Fig 7).

쏘가리의 면역유전자는 일반적인 상태에서 IRF1을 제외하고 신장에서 그 발현정도가 높게 나타났고, 간과 비장에서는 유사하게 나타났다. IRF1은 간에서 그 발현정도가 가장 높게 나타났다. 면역유전자 중에서는 비특이적 면역에 관여하는 인터루킨 8이 일반적인 상태에서 가장 높게 발현되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

Immune related protein	Tissue	ΔC_T value	
Interferon induced protein (ISGs)	Kidney	7.94	
	IRF1	Liver	8.66
		Spleen	6.24
		Kidney	8.65
	IRF2	Liver	7.63
		Spleen	7.21
		Kidney	9.09
	IRF7	Liver	6.64
		Spleen	7.23
		Kidney	7.29
	Mx protein	Liver	5.99
		Spleen	5.22
		Kidney	7.11
	Viperin	Liver	5.90
		Spleen	5.13
Inflammatory protein		Kidney	14.95
	Interleukin 8	Liver	15.48
		Spleen	12.82

Table 6. ΔC_T values of immune related proteins of *S.sherzeri* in Basal levels.

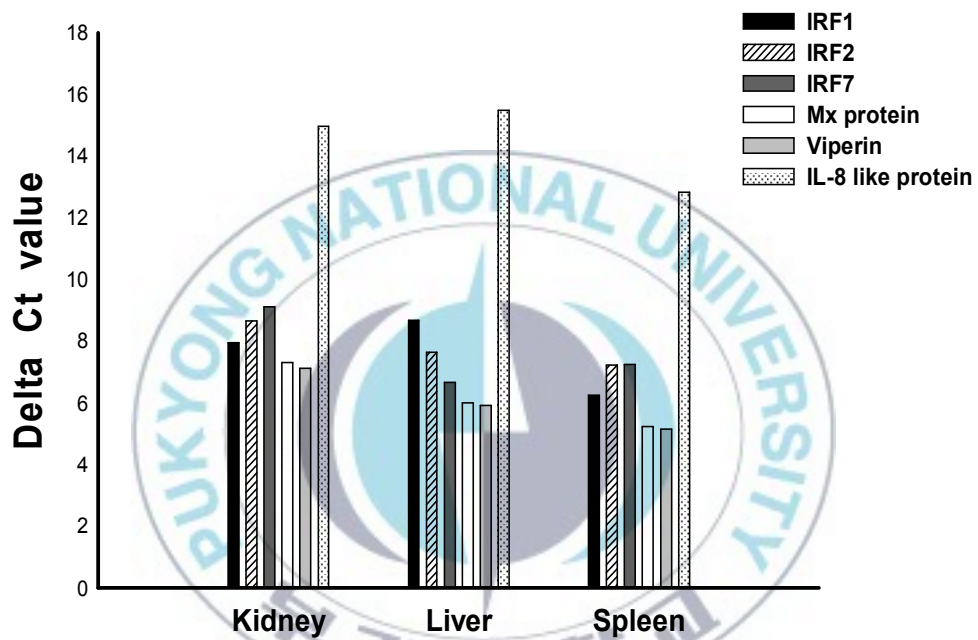


Fig 7. Basal expression levels of immune related proteins in different tissues of *S.sherzeri*.

5-2. 쏘가리 면역유전자의 발현 분석

5-2-1. IRF1

PGIV-1 인위 감염 후 1일째에 신장과 비장에서 대조군보다 IRF1의 발현이 조금 줄어드는 현상을 보였으나, 10일째가 되자 0일째에 비해 약 2~2.5배 정도로 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

간에서는 0일째의 발현량에 비해 인위 감염 1일째와 4일째에 점차 증가하다가 10일째에 그 발현량이 0일째보다 4.5배로 급격히 증가하였다(Fig 8).

5-2-2. IRF2

신장, 비장, 간에서 모두 인위 감염 1일째에 대조군의 것에 비해 IRF2의 발현량이 낮게 나타났다. 간에서는 인위 감염 1일째에 IRF2의 발현량이 감소하였는데, 이러한 현상은 4일째까지 유사한 양으로 유지되다가 10일째에는 더 감소하는 결과를 보였다. 그러나 신장과 비장에서는 인위 감염 1일째에 잠시 그 양이 줄었으나 4일째 다시 증가하는 현상이 나타났다. 양적 차이는 다소 있었으나 공통적으로 10일째 감소하는 경향을 보였다. IRF2의 경우 그 발현량이 증가한 경우가 나타났지만, 양적으로 0일째보다 낮은 양인 것을 관찰할 수 있었다(Fig 9).

5-2-3. IRF7

IRF7의 경우 감소와 증가의 패턴이 IRF2와 매우 유사하게 나타난 것을

관찰 할 수 있었다. 모두 대조군의 발현량에 비해 낮은 양이었지만, 신장과 비장에서 4일째 증가하였다가 10일째 다시 감소하는 패턴을 보였고, 간에서는 1일째부터 감소하기 시작하여 4일째에도 지속적으로 감소하는 것이 관찰되었다(Fig 10).

5-2-4. Mx protein

Mx protein은 분석된 면역유전자 중 발현량이 증가한 시기가 가장 다양하게 나타났다. 신장, 간에서는 공통적으로 인위 감염 1일째에 발현량이 줄어드는 것이 관찰되었지만 비장의 경우 1일째부터 발현량의 증가를 보였다. 신장의 경우 감염 1일째에 잠시 감소하였다가 4, 10일째에 대조군에 비해 발현량이 증가하였다. 간의 경우 4일째 증가가 나타나기 시작하여 10일째까지 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다. 비장에서는 1일째부터 그 발현량이 증가하기 시작하여 4일째까지 증가되다가 10일째에 발현량이 감소하는 것이 관찰되었다(Fig 11).

5-2-5. Viperin

PGIV-1 인위 감염 1일째에 신장, 비장, 간에서 모두 발현량이 감소하였으나 신장과 비장의 경우 감염 4일째부터 증가하기 시작하여 10일째에 발현량이 최고치로 나타났다. 그러나 10일째 신장과 비장에서 나타난 최고 수치는 0일째의 쏘가리에서 발현되는 양과 유사하였다.

간에서는 4일째까지 감소하는 형태가 나타나다가 10일째에는 0일째에 비하여 3.5배 정도로 그 발현량이 급격히 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig 12).

5-2-6. 인터루킨 8

인터루킨 8은 신장과 비장에서 유사한 패턴이 관찰되었는데, 인위 감염 1일째에서 4일째까지 감소하는 형태를 보이다가 10일째에는 그 양이 각각 신장에서는 10배가, 비장에서는 8배로 급격히 증가하는 양상을 보였다. 반면 간에서는 1일째까지 별 다른 변화가 없다가 4일째, 10일째에 발현량이 증가하는 것을 볼 수 있었으나 이는 모두 0일째의 발현량 보다 낮은 수준으로 관찰 되었다(Fig 13).



IRF1

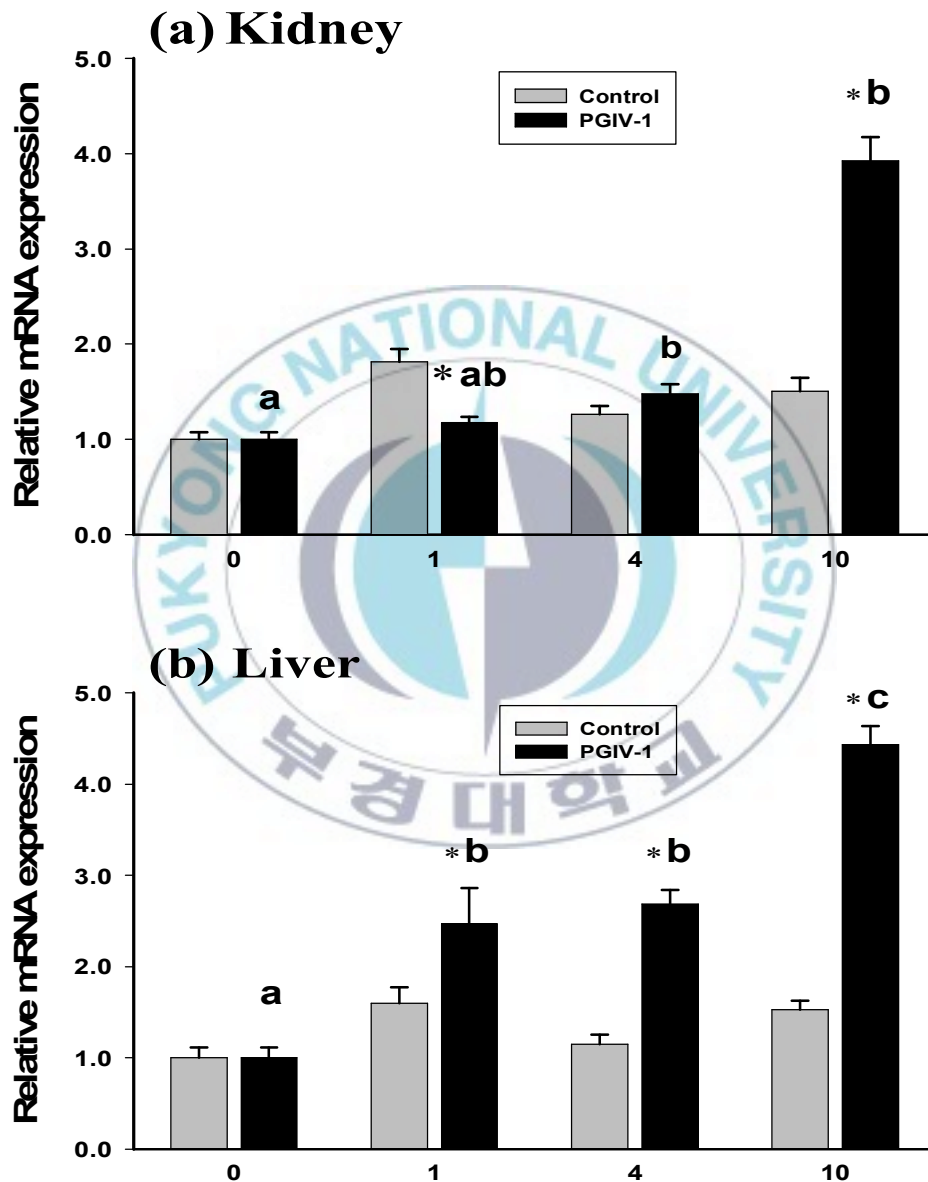


Fig 8. Continued.

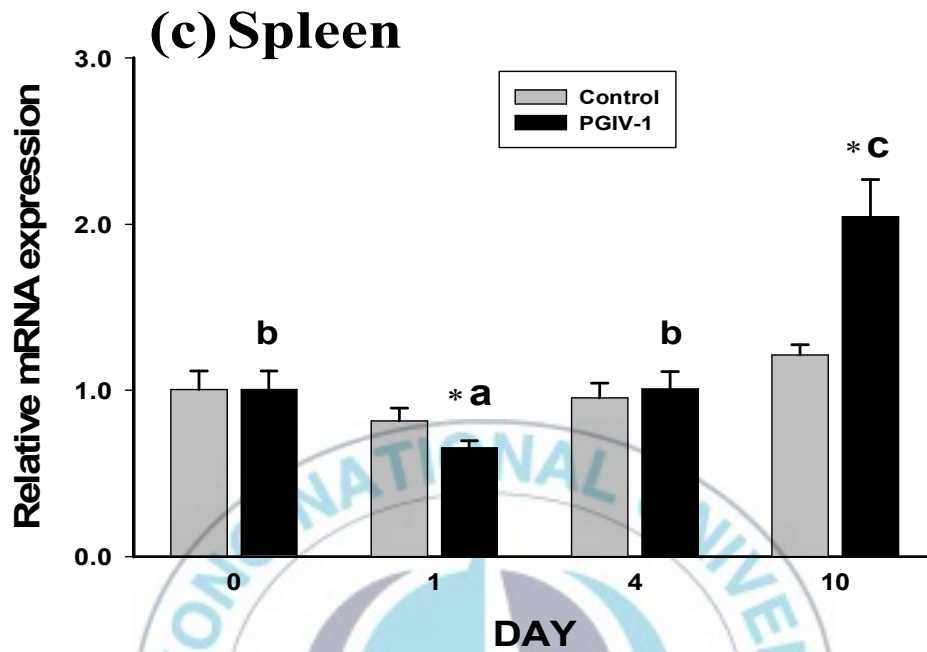


Fig 8. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of IRF1 by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

IRF2

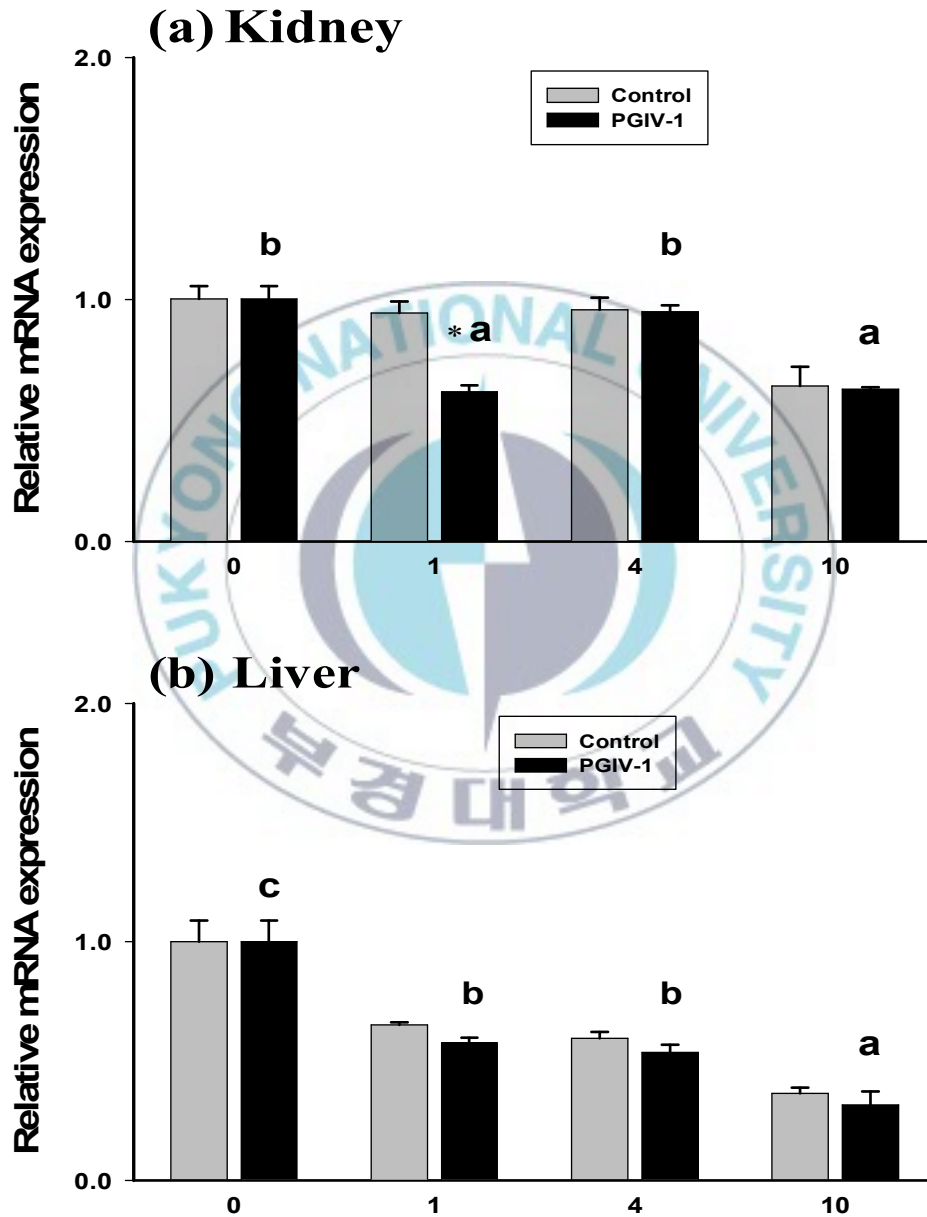


Fig 9. Continued.

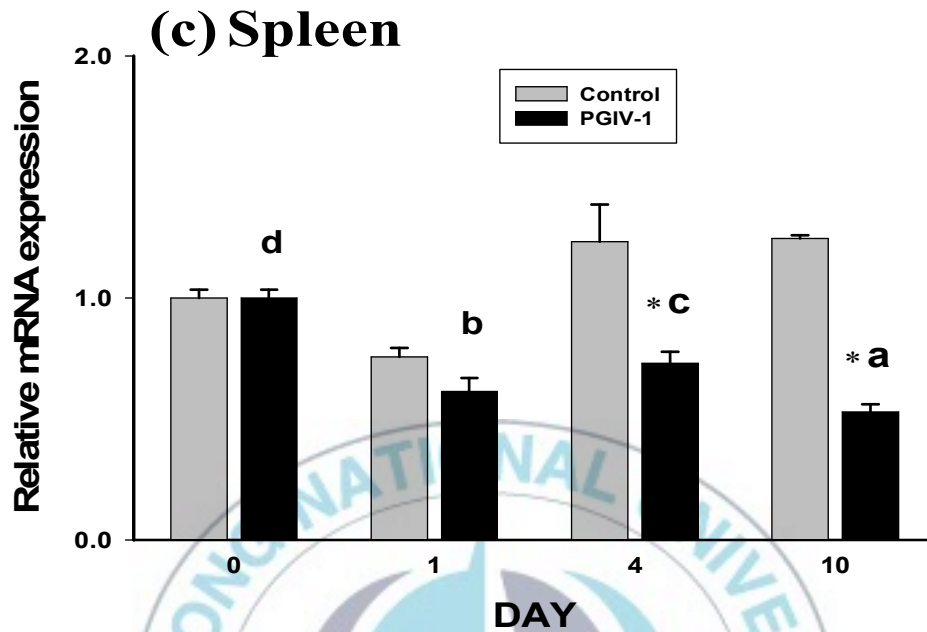


Fig 9. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of IRF2 by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c, d) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

IRF7

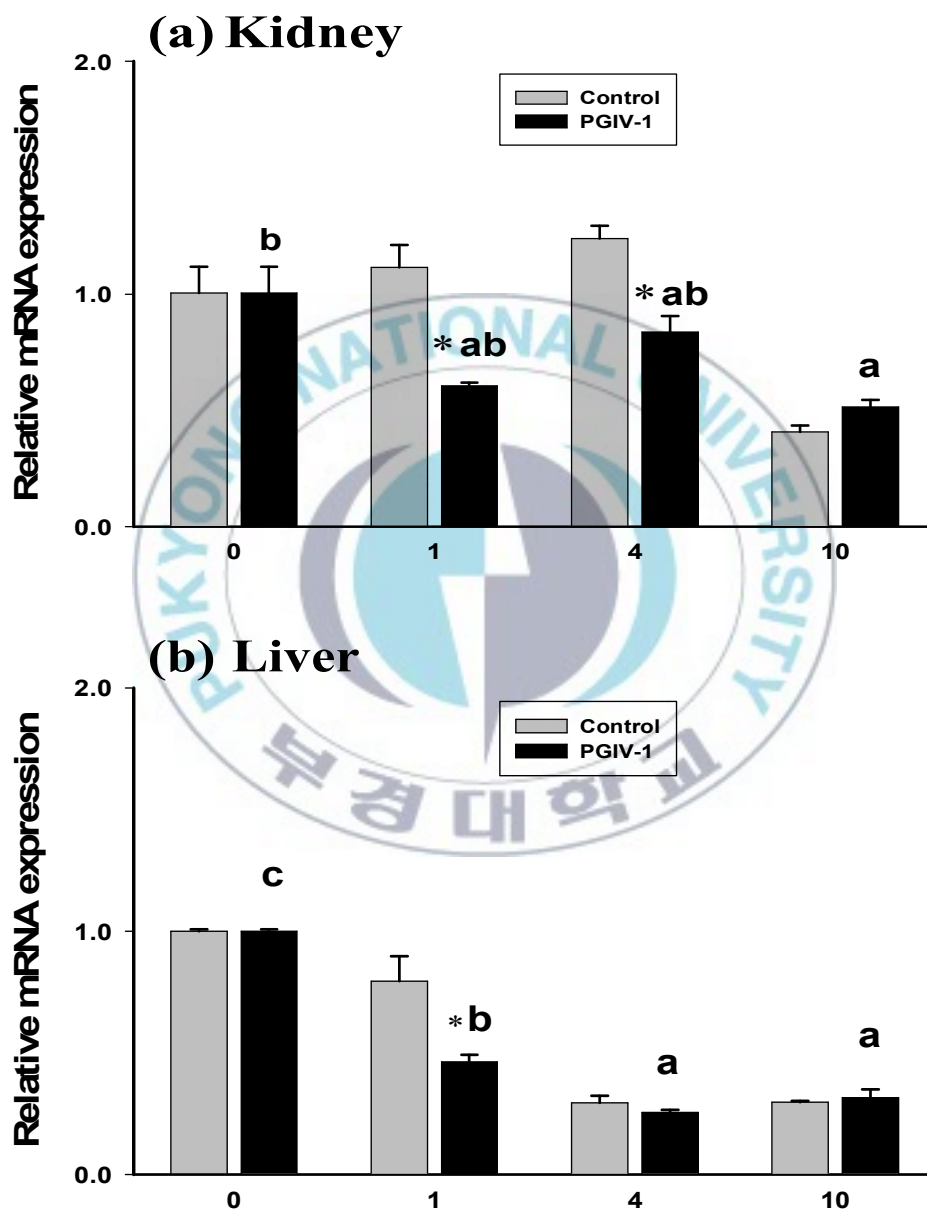


Fig 10. Continued.

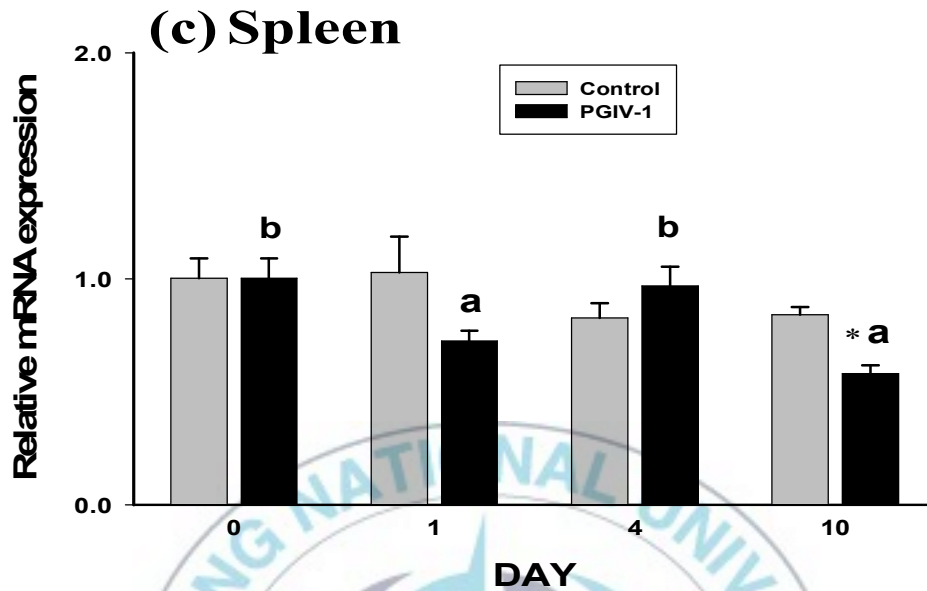


Fig 10. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of IRF7 by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

Mx protein

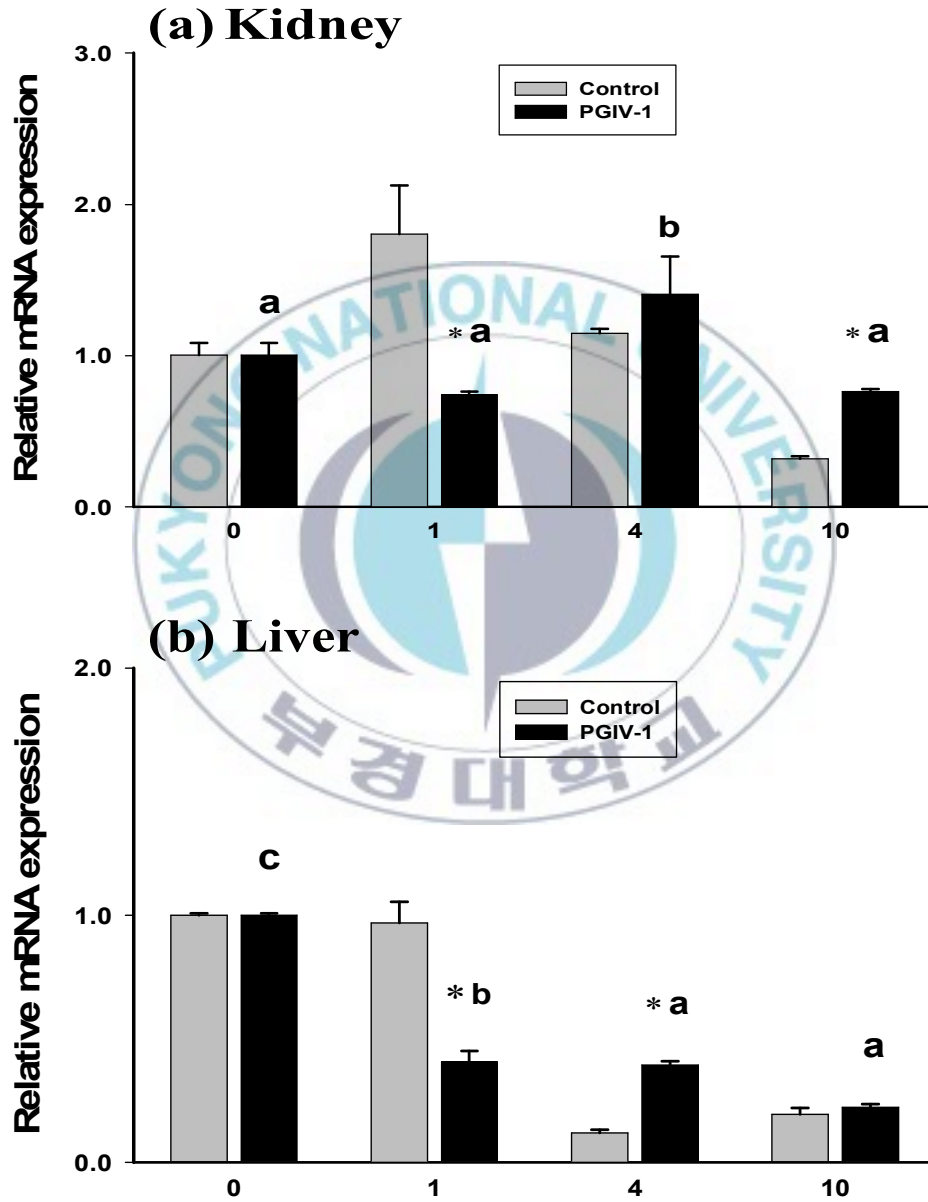


Fig 11. Continued.

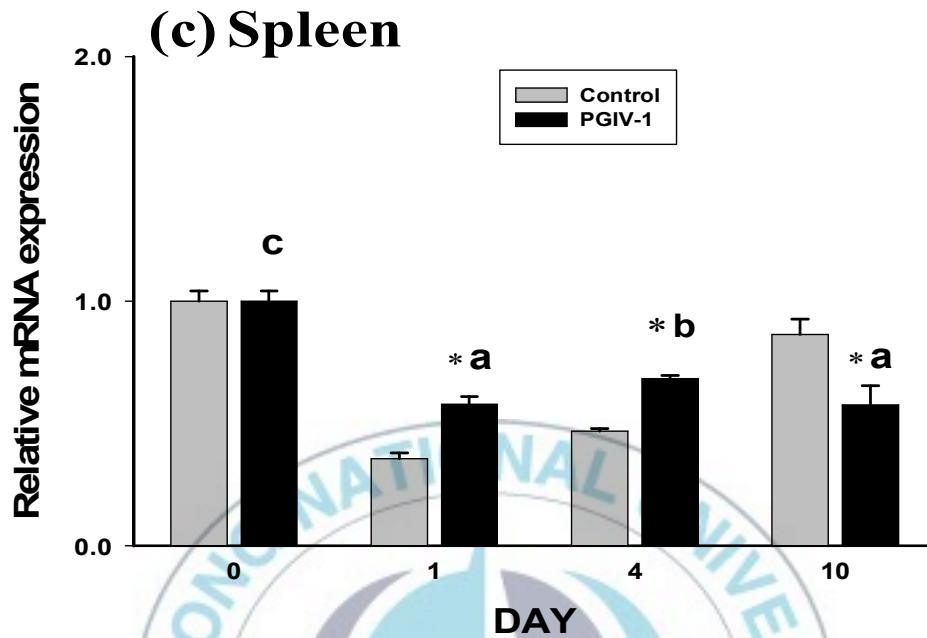


Fig 11. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of Mx protein by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

Viperin

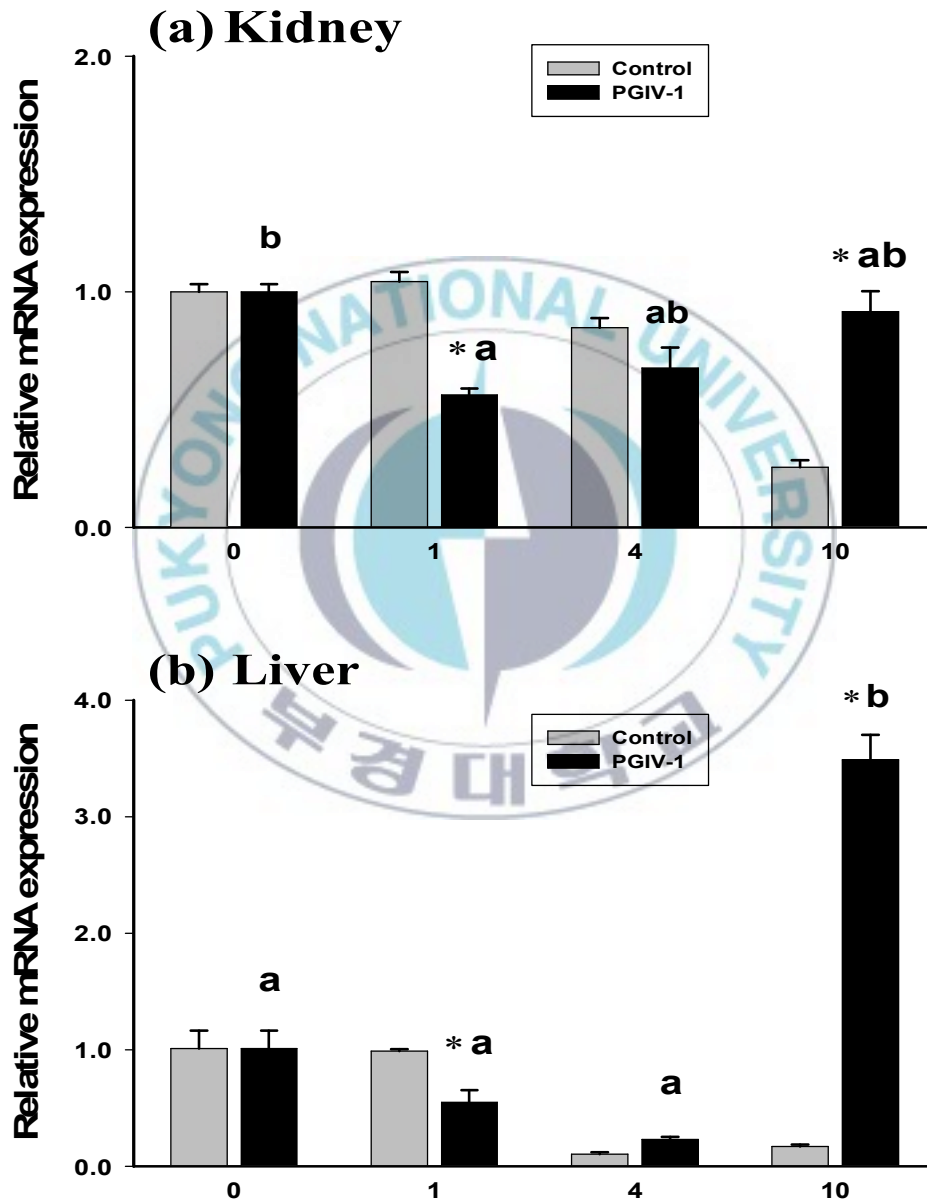


Fig 12, Continued.

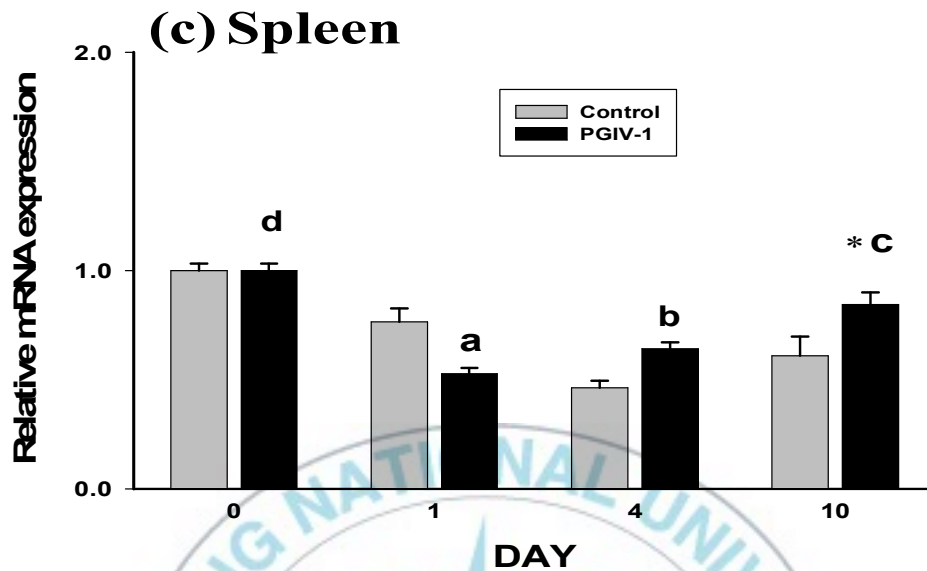


Fig 12. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of viperin by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

IL-8

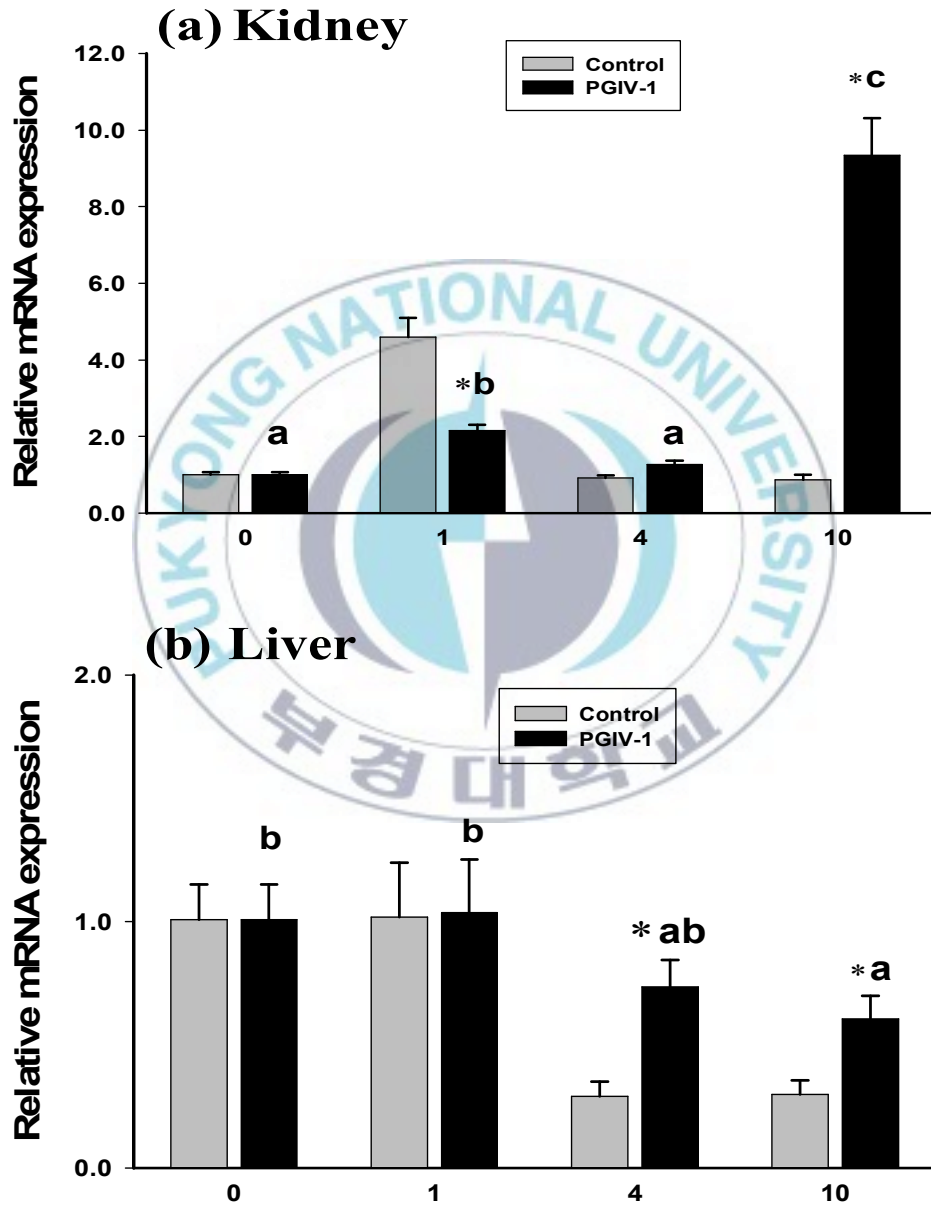


Fig 13. Continued.

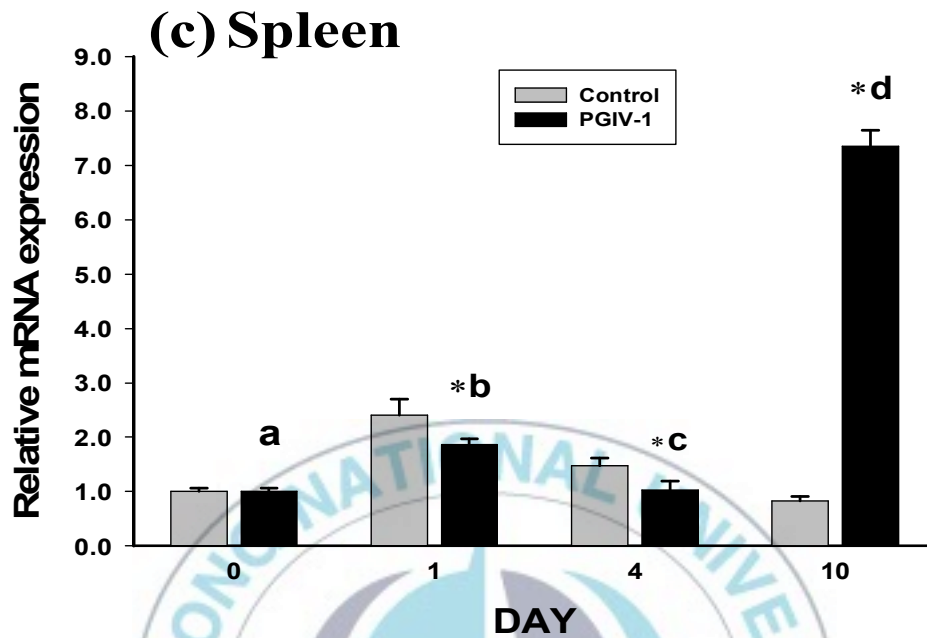


Fig 13. Relative expressions (mean $\pm$ SD) of IL-8 by i.p injection of PGIV-1. Columns with asterisk indicate significant differences between control and PGIV-1 injected group ($P < 0.05$). Columns with different letters(a, b, c, d) are significant differences among the different time points ($P < 0.05$).

IV. 고 찰

ISKNV는 1994와 1999년도 사이에 빈번히 발생하기 시작하여 (Wu *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; Zhang and Li, 1999; Fang *et al.*, 2000) 현재 까지 중국의 mandarin fish *Siniperca chuatsi* 양식에 심각한 피해를 일으키는 원인체이다. Megalocytivirus에 속하는 ISKNV는 숙주의 범위가 광범위할 뿐 아니라 환경적인 요소에 대한 영향을 덜 받기 때문에 해수어와 담수어를 포함한 다양한 어종에서 발견되고 있다 (Jeong *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011).

본 연구에서는 광범위한 숙주범위와 환경변화에 대한 높은 적응력을 가지고 있는 ISKNV strain 중에서 필 구라미에서 분리된 PGIV-1을 이용하여 중국에서 ISKNV의 감염에 의한 피해가 심각하게 나타나는 mandarin fish *Siniperca chuatsi*와 동일한 family *Percichthyidae*에 속하는 우리나라의 대표적인 담수어종인 쏘가리 *Siniperca scherzeri*에 인위 감염시켜 그 감염 가능성에 대해 확인하고자 하였다. 또한 바이러스 감염에 의해 활성화되는 쏘가리의 면역시스템에 대한 정보를 얻기 위하여 쏘가리에서 발현되는 IFN-induced genes(ISGs)와 초기 염증반응에 관여하는 인터루킨 8-like protein 등의 면역유전자를 클로닝하여 단백질 서열을 분석한 뒤, mandarin fish *S. chuatsi*의 것과 비교하였고, 감염 후 경과시간에 따른 면역유전자의 발현량을 조직별, 면역유전자별로 비교·분석하였다.

쏘가리 *S. scherzeir*에서의 이리도바이러스의 감염가능성을 알아보기 위한 누적폐사율 측정실험을 실시한 결과, PGIV-1를 복강주사하고 10일에

서 11일째 되는 날부터 폐사하기 시작하여 일주일 이내에 100% 폐사가 나타나는 것을 확인 할 수 있었는데, ISKNV의 인위 감염실험의 경우 zebrafish *Danio rerio*와 spotted green puffer fish *Tetraodon nigroviridis*를 대상으로 시도된 바 있다. 그 결과 zebrafish에서만 임상적 증상이 나타나면서 감염 9일째 100% 폐사가 나타났다고 보고되어지고(Zu *et al.*, 2008), 이와는 달리 spotted green puffer fish에서는 감염 4일째에 비장에서 이리도바이러스 감염의 대표적인 특징인 이형비대세포가 관찰되었으나 14일째에 정상적인 세포로 돌아오는 것이 관찰되었고, 폐사는 전혀 나타나지 않았다고 보고된다(Zu *et al.*, 2010). Rock bream *Oplegnathus fasciatus*의 경우 본 연구에서 사용된 바이러스와 동일한 담수관상어에서 분리한 ISKNV-like virus인 PGIV-1 를 인위 감염시키자 인위 감염 9일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 하루 또는 이틀 사이에 100% 폐사가 관찰된 연구결과가 있다(Jeong *et al.*, 2008). 그러나 동일한 바이러스인 PGIV-1에 감염된 펄 구라미의 경우 폐사가 10일째부터 나타나기 시작하여 100% 폐사까지 9일 정도가 소요되었다고 보고되는데(Jeong *et al.*, 2008), 이는 쏘가리에서 나타나는 폐사의 유형과 유사한 것으로 확인되었다. 그러므로 ISKNV-like virus에 인위 감염된 담수어 또는 해수어 몇몇에서 나타나는 폐사율과 쏘가리에서 나타나는 폐사율을 비교했을 때 펄 구라미의 폐사율과 가장 유사한 것을 알 수 있었다. PGIV-1이 분리된 펄 구라미에서 나타나는 폐사율과 폐사가 시작되는 시기 및 진행 속도가 매우 유사한 것으로 보아 이리도바이러스의 숙주에 대한 감수성과 증식속도가 펄 구라미와 쏘가리에서 유사한 것으로 해석이 된다.

농도별 폐사율 측정 실험에서는 PGIV-1에 감염되어 폐사가 나타난 쏘가리 신장조직의 마쇄액을 단계희석 하여 각각 $100\mu\text{g fish}^{-1}$, $10\mu\text{g fish}^{-1}$,

1 μ g fish⁻¹ 의 농도로 복강 주사하고, 그룹별로 쏘가리에서 나타나는 폐사를 변화를 관찰하고자 하였다.

어체 당 PGIV-1에 감염된 신장조직 100 μ g을 인위 복강 주사한 그룹에 비해 10 μ g 그룹의 경우 그 폐사 속도가 점점 늦어지는 유형을 보였으나, 100% 폐사에 도달하는 속도에서만 차이를 보이고 PGIV-1 감염 신장조직 1 μ g이 복강 주사된 그룹을 제외한 모든 그룹에서 100% 폐사가 나타났다. 가장 적은 양의 PGIV-1 감염조직이 주입된 1 μ g fish⁻¹ 그룹에서는 PBS그룹과 동일하게 30일 이상이 될 때까지 아무런 폐사도 나타나지 않았다. 이를 미루어 볼 때 쏘가리에서 나타나는 PGIV-1의 감염과 폐사하는 속도는 감염되는 바이러스 농도의 영향을 크게 받고, 일정한 농도 이하의 경우 바이러스가 침입하여도 쏘가리에서 감염 및 폐사를 나타내지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

쏘가리에서 PGIV-1의 인위 감염에 대한 가능성을 확인한 뒤 이러한 이리도바이러스에 감염되었을 때 쏘가리에서 나타나는 면역유전자 발현에 대해서 분석하였다. 경골어류에 바이러스가 침입하면 활성화되는 최초의 방어기작으로는 인터페론과 이러한 인터페론에 의해 자극되어 나타나는 interferon-induced genes(ISGs)에 의한 것이 대표적이다(Eloi R *et al.*, 2011). 대표적인 ISGs에는 인터페론의 분비를 감지하는 역할을 하는 interferon regulatory factors(IRFs), IFN의 자극에 의해 세포에서 분비되는 항 바이러스성 단백질인 viperin과 Mx protein 등이 있다. 이러한 면역유전자들은 여러 종류의 경골어류에서 그 발현이 확인되었지만, 전체 척추동물에 속하는 종에서 거의 절반을 차지하는 경골어류 종의 수를 고려하면 아직까지 그 면역유전자들에 대한 정보가 많이 부족한 실정이다. 이에 초기 항 바이러스성 면역반응에 관여하는 면역유전자들이 쏘가리에서 어떠한 특성으로 발현하는지 알아보기 위해 쏘가리에 이리도바이

러스를 인위 감염시키고, 시간 경과에 따른 조직별 IRFs(IRF1, IRF2, IRF7), Mx protein, viperin, 인터루킨 8의 발현량과 발현유형을 분석하였다.

먼저 쏘가리에 발현하는 면역유전자를 클로닝 하기 위해 mandarin fish *S.chuatsi*의 ORF부분으로부터 degenerated 프라이머를 제작하여 PCR 증폭 후, 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석을 실시한 결과 쏘가리에서 나타난 면역유전자 IRF1 267bp, IRF2 579bp, IRF7 831bp, Mx protein 201bp, Beta-actin 486bp의 부분 염기서열을 얻을 수 있었다. 위의 면역유전자의 염기서열로부터 아미노산서열을 분석한 뒤 종별로 나타나는 차이를 확인하기 위해 쏘가리의 것과 mandarin fish의 아미노산 서열을 비교하였다. 그 결과 쏘가리에서 발현되는 IRF1는 mandarin fish에서 발현되는 IRF1의 158~160번째, 176번째 아미노산과 차이가 났고, IRF2는 mandarin fish의 176번째, 237번째의 아미노산 서열과 차이를 보였다. 클로닝한 면역유전자 중에서 쏘가리에서 가장 많은 차이가 나타난 IRF7은 mandarin fish의 35~39번째, 211번째, 300~305번째 아미노산서열에서 차이가 나타났다. Mx protein의 경우 mandarin fish의 545번째의 아미노산이 쏘가리에서는 삭제된 것을 관찰할 수 있었고, 각각 547, 577, 608~609번째 아미노산과 차이를 보였다.

결론적으로 IRF1, IRF2, IRF7, Mx protein 그리고 viperin의 아미노산 서열의 비교를 통해 본 연구에서 밝혀진 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 부분 cDNA의 염기서열이 mandarin fish에서 발현되는 것과 부분적으로 차이가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 mandarin fish와 쏘가리 사이에서 나타나는 차이 뿐 아니라 다른 어종에서 발현되는 면역유전자들과의 계통학적 분석을 하기 위해서 쏘가리에서 발현되는 면역유전자의 전체 염기서열 및 아미노산서열의 분석이 추가적으로 필요하

다고 사료된다.

쏘가리 *S.scherzeri*에서 나타나는 면역유전자의 발현 특성을 분석하기 위해 먼저 쏘가리에 발현하는 IRF1, IRF2, IRF7, Mx protein, viperin, 인터루킨 8의 basal expression level을 확인한 결과 IRF2, IRF7, Mx protein, viperin은 신장에서의 발현정도가 가장 높게 나타났고, 반면 인터루킨 8과 IRF1은 간에서 그 발현 정도가 높게 나타났다. 그리고 초기 염증반응에 관여하는 인터루킨 8의 양이 ISGs보다 월등히 많이 발현해 있다는 사실을 확인 할 수 있었다. 뿐 만 아니라 이리도바이러스 주입 후 경과시간에 따른 면역유전자 발현량을 측정한 결과 간에서는 4일째에, 신장과 비장에서는 10일째에 그 발현량이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었고, 10일째에 신장과 비장에서 발현된 양은 0일째에 비해 각각 10배와 8배 정도 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 반면 간에서는 4일째 증가한 양이 10일째까지 유지되는 형태를 보였으며, 급격한 증가는 관찰 되지 않았다. 이와 같이 쏘가리에서 관찰된 인터루킨 8의 급격한 증가는 viral haemorrhagic septicemia virus(VHS)에 감염된 olive flounder에서도 유사하게 나타나는 것으로 보고되고 있다(Avunje *et al.*, 2011). 인터루킨 8은 포유류에서 나타나는 chemokine 중에서 최초로 발견된 것으로 염증반응 중 호중구의 이동에 관여하며(Baggiolini *et al.*, 1989), 경골어류에서도 면역자극제나 감염에 의한 호중구의 이동시키는 역할을 한다고 보고되고 있다(Huising *et al.*, 2003; Stakauskas *et al.*, 2007). 경골어류 중에서는 rainbow trout와 catfish(Laing *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005)에서 그 특성이 규명된 바 있는 인터루킨 8은 건강한 세포에서는 그 발현이 좀처럼 확인되지 않지만, TNF- α , 박테리아, 바이러스 등 여러 종류의 자극에 대해 그 반응이 매우 급격하게 나타나기 때문에 10~100배 정도 그 양적 차이가 나기도한다고 보고되고 있다(Nevien *et al.*, 2009).

결론적으로 쏘가리의 경우 발현되어있는 인터루킨 8의 정도가 월등히 높았다는 결과와 각 조직, 특히 신장과 비장에서 10일째 그 발현량이 급격히 증가한 사실로 미루어 볼 때 쏘가리에서도 다른 경골어류와 마찬가지로 인터루킨 8이 바이러스 침입시 방어역할을 한다는 사실을 확인할 수 있었고, 쏘가리에서는 다른 ISGs에 비해 인터루킨 8의 발현량이 월등히 높게 나타난 점을 미루어 볼 때 인터루킨 8의 항 바이러스성 활성이 가장 활발하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

쏘가리에 발현되는 ISGs 중에서 IRF1, IRF2 그리고 IRF7에 대한 발현량 변화들을 분석한 결과, 3가지의 interferon regulatoty factor 중 IRF1의 발현량이 가장 특징적으로 나타났다. 쏘가리에서 IRF1의 기본적인 발현정도는 간, 신장, 비장 순서로 높게 나타났는데, 이는 비장, 신장, 간의 순서로 높게 나타난 mandarin fish의 발현양상과는 다른 결과였다(Sun *et al.*, 2007). 그러나 계통학적으로 mandarin fish와 24%의 상동성을 띠면서 large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*에서 발현되는 IRF1의 발현양상(Yao *et al.*, 2010)과는 유사하게 나타난 것으로 미루어 볼 때 동일한 종이라 할지라도 그 기본적인 면역유전자의 발현량이 조직별로 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다. PGIV-1 주입 후 시간경과에 따른 IRF1의 변화는 10일째 가장 두드러지게 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이것은 모든 조직에서 공통적으로 나타났는데, 0일째에 비해 증가한 발현량은 2~2.5배가 증가한 비장에 비해 4~4.5배가 증가한 간과 신장에서 가장 높게 나타났다.

바이러스의 침입이나 IFNs, pro-inflammatory 클로닝s에 의해 발현되는 IRF1는 그 발현량이 증가함으로써 사이토카인의 활성을 증가시키고 결과적으로 사이토카인이 효과적으로 바이러스침입에 대해 효과적으로 방어하도록 하는 필수적인 요소라고 보고되고 있다(Harada *et al.*, 1989;

Kimura *et al.*, 1994). 이를 미루어 볼 때 쏘가리에서 IRF1의 발현이 높게 나타난 현상은 결과적으로 바이러스 침입에 효과적으로 방어하기 위해 인터루킨 8의 양을 특징적으로 증가시키는 상호작용이 나타난 것으로 해석된다. IRF2와 IRF7의 경우 발현하는 양상이 유사하게 나타났다. IRF2와 IRF7 모두 어떤 조직에서도 특징적인 증가는 관찰할 수 없었지만, 1일, 4일, 10일째에 지속적으로 발현하는 것을 관찰 할 수 있었다.

일반적으로 IRF2는 IFNs 과 ISGs를 활성화시키는 IRF1과 반대로 활성을 억제하는 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다(Baojian *et al.*, 2006). 그러므로 쏘가리에 바이러스 주입시 발현량이 특징적으로 증가된 IRF1에 비해 두드러진 발현량의 변화가 관찰되지 않은 IRF2는 서로 길항작용에 의해 나타난 결과로 사료된다. 반면 IRF7의 경우 zebrafish와 orange-spotted grouper에서 그 발현량이 각각 바이러스 주입 후 3일째 증가했다고 보고되고 있지만(Xiang *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2010), 쏘가리에서는 특징적인 증가현상 없이 지속적으로 발현하는 것을 관찰 할 수 있었다. Viperin의 발현양상은 IRF1과 매우 유사하게 나타났다. 10일째에 모든 조직에서 공통적으로 발현량이 증가하였는데, 특히 간에서는 0일째에 비해 3.5배 정도가 증가한 것을 관찰 할 수 있었다. IRF1과 마찬가지로 신장과 비장에서 0일째 대비해 발현량의 증가가 나타나기는 했으나, 간에서 발현된 양에 비해서는 매우 적은 양이었다. Viperin과 IRF1의 유사한 발현양상은 척추동물에서 viperin의 발현이 IRF1의 발현을 유도한다는 연구결과(Stirnweiss., 2010)로 미루어 봤을 때 이와 동일한 현상이 쏘가리의 항 바이러스성 방어기작에서도 나타나는 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 척추동물에서 IRF1과 viperin의 발현이 cytokine의 활성을 야기 시킨다는 연구결과(Harada *et al.*, 1989, Ayala *et al.*, 1992)를 미루어 볼 때 쏘가리의 IRF1, viperin, 인터루킨 8의 발현량 증가 시기가 동일하

다는 점에서 척추동물에서 나타나는 면역유전자간의 상호작용이 쏘가리에서도 나타난다는 것을 확인 할 수 있었다.

반면 이리도바이러스 주입 후 10일째에 특징적인 발현량의 증가를 보인 IRF1, 인터루킨 8, viperin과는 달리 Mx protein의 경우 신장과 간에서 4일째부터 증가를 보이면서 그러한 양상이 10일째까지 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 비장에서는 1일째부터 발현량이 증가하기 시작하여 4일째까지 유지되다가 10일째에 감소하는 양상을 보였다. 경골어류의 Mx protein의 3가지 isoform인 Mx1, Mx2 그리고 Mx3가 밝혀져 있으며 흥미롭게도 바이러스 또는 poly(I:C)를 주입한 무지개 송어와 돛류에서 Mx protein의 isoform임에도 불구하고 조직별로 그 발현양상이 틀리게 나타난다고 보고되고 있다(Tafalla *et al.*, 2007; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2011). 본 연구에서 분석된 Mx prtoein의 경우에도 조직별로 발현되는 양상이 다르게 나타난 것으로 미루어 볼 때 쏘가리에서 발현된 Mx protein의 isoform의 규명에 대한 연구가 추가적으로 필요하다고 사료된다.

결론적으로 쏘가리에 이리도바이러스 주입시 발현되는 면역유전자 중에서 IRF1, 인터루킨 8, viperin이 어체 내에서 발생하는 상호작용에 의해 발현하는 양상이 유사하게 나타났고, Mx protein의 경우 그 발현량이 조직별로 차이는 보였다. 반면 IRF2 와 IRF7의 경우 특징적인 증가는 관찰되지 않았으나, 바이러스 주입 후 지속적으로 발현이 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다.

본 연구는 쏘가리를 대상으로 이리도바이러스의 인위 감염 여부와 그에 따른 누적폐사율을 분석하고, 이리도바이러스 주입에 따른 면역유전자의 발현 특성에 대해 분석한 최초의 연구로 본 연구에서 실시한 쏘가리의 면역유전자 발현에 대한 결과는 아직까지 알려지지 않은 쏘가리 면역시

시스템에 관련한 정보를 제공할 수 있을 것이라 기대하며, 더 나아가서 쏘가리에서 발현되는 면역유전자의 전체 아미노산 서열의 규명과 계통학적 분석 뿐 아니라 기존의 경골어류에서 밝혀진 다른 면역유전자의 클로닝에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.



V. 요약

Family *Iridoviridae*, genus *megalocytiirus*에 속하는 infectious necrosis virus(ISKNV)는 중국의 mandarin fish에서 발생하여 심각한 피해를 입히는 원인체로 자연산 어류 뿐 아니라 양식산 어류에 미치는 생태적, 경제적 영향력 때문에 더욱 관심이 집중되고 있다. ISKNV는 감염되는 숙주 범위가 매우 광범위하여 해수 뿐 아니라 담수에 서식하는 다양한 종에서 분리되고 있고, 그 strain의 종류도 계속해서 늘어나고 있다. 우리나라에서도 싱가포르 또는 중국에서 수입된 담수관상어인 pearl gourami *Tricogaster leerii* 에서 새로운 ISKNV-like virus가 최초로 분리되었고, rock bream *Oplegnathus fasciatus* 에서의 교차감염 실험에서 그 병원성이 해수어에서도 유지된다는 사실이 밝혀졌다.

이에 중국의 mandarin fish *Siniperca chuatsi*와 동일한 *Percichthyidae* family인 우리나라의 쏘가리에 pearl gourami에서 분리된 ISKNV-like virus인 PGIV-1을 인위 감염시켜서 폐사가 나타나는지 확인하였고, PGIV-1를 인위 감염시킨 쏘가리에서 발현하는 면역유전자의 발현 특성을 분석하였다.

PGIV-1를 $100\mu\text{g fish}^{-1}$, $10\mu\text{g fish}^{-1}$, 로 복강 주사한 뒤 폐사율을 측정하였다. 저농도로 PGIV-1을 인위감염 시킨 그룹에서는 고농도의 그룹보다 폐사가 시작되는 시기가 비교적 천천히 나타는 경향을 보였으나 결국에는 모든 그룹에서 100% 폐사가 나타났다. $1\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 인위 감염시킨 그룹과 대조군에서는 30일이 지나도록 폐사가 나타나지 않았다.

Mandarin fish의 면역유전자에서 degenerated 프라이머를 제작하여 쏘가리에서 발현하는 면역유전자를 클로닝 하고 madarin fish와의 아미노산 서열과 비교한 결과 몇몇 아미노산에서 차이를 보였지만, 대체적으로 유사하게 나타났다.

PGIV-1 인위 감염 후 0, 1, 4, 10일째에 나타나는 면역유전자의 상대적 발현량을 산출하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 어류에서 나타나는 항 바이러스성 물질인 interferon-induced genes(ISGs)중에서 IRF1, IRF2, IRF7, Mx protein, viperin과 인터루킨 8의 발현량을 PGIV-1 인위 감염 후 각각 0, 1, 4, 10일째에 측정하였다. 0일째의 발현량과 비교해서 10일째에 인터루킨 8은 10배, IRF1은 2.5배, viperin에서는 3.5배정도가 인위 감염 후 증가한 것으로 나타났고, IRF2와 IRF7, Mx protein의 경우 비교적 발현량이 비교적 낮았지만 지속적으로 나타난 것을 알 수 있었다.

VI. 감사의 글

어렵게 학위를 받게 된 만큼 그 성취감과 도와주신 분들에 대한 감사함이 더 커지는 것 같습니다. 우선 많이 부족한 저를 배려해주시고, 이끌어 주신 존경하는 스승이신 정현도 교수님께 감사드립니다. 그리고 잘 찾아 뵙지 못해도 뵈는 때마다 항상 반갑게 맞아주신 박수일 교수님, 허민도 교수님, 정준기 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님, 정말 감사드리고, 항상 존경하고 있습니다. 직장에서 일하면서 석사과정을 밟는 동안 참 힘든 적이 많았는데, 그때마다 관심과 격려를 아끼지 않고 해주신 소장님과 중앙내수면연구소에 계시는 여러 박사님들께 감사 말씀 드립니다. 또 실험할 때 많은 도움을 준 우리 방역실 팀원들에게도 감사의 말 전합니다. 지금은 캐나다에 계시는 김진형 박사님, 박사님께서 계셨기에 가능했습니다. 주옥같은 말씀들 마음에 새기겠습니다. 감사합니다.^^

멀리 부산에 있는 저의 소중한 분들에게도 감사드립니다. 진단생화학 실험실 식구들 너무 너무 고맙습니다. 그리고 곁에서 항상 든든한 지원군이 되어주는 우리 만신창이들과 그 남편들~ 나의 노력에 대해 누구보다 잘 알아주고 격려해주는 너희들이 있어서 너무 행복해. 항상 고맙고, 사랑해!! 또 누구보다 가장 가까이에서 힘들었을, 그래도 곁을 지켜준 세상에서 가장 멋지고 소중한 사람에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

마지막으로 너무 너무 사랑하는 우리 가족들에게 감사의 말씀 올립니다. 제가 가장 닮고 싶은 우리 부모님, 캐나다에서 고생하는 우리 지혜, 이제 누나보다 키가 훌쩍 커버린 우리 규철이, 너무 너무 고맙고 사랑합니다.

항상 지금을 기억하고, 앞으로 나아가겠습니다.



VII. 참고 문헌

- Au, W. C., P. A. Moore, et al. (1998). "Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes." *Journal of Biological Chemistry* 273(44): 29210-29217.
- Avunje, S., W. S. Kim, et al. (2011). "Toll-like receptors and interferon associated immune factors in viral haemorrhagic septicaemia virus-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)." *Fish and Shellfish Immunology* 31(3): 407-414.
- Barnes, B., B. Lubyova, et al. (2002). "On the role of IRF in host defense." *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22(1): 59-71.
- Bergan, V., O. Kileng, et al. (2010). "Regulation and function of interferon regulatory factors of Atlantic salmon." *Mol Immunol* 47(11-12): 2005-2014.
- Caipang, C. M. A., I. Hirono, et al. (2003). "In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx." *Virology* 317(2): 373-382.
- Caipang, C. M. A., C. C. Lazado, et al. (2011). "Differential expression of immune and stress genes in the skin of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 6(2): 158-162.
- Chen, C., Z. Li, et al. (2009). "Cloning, characterization and expression analysis of a CXCR1-like gene from mandarin fish *Siniperca chuatsi*." *Fish Physiol Biochem* 35(3): 489-499.
- Collet, B., C. McDonald, et al. (2003). "The promoter for the Interferon Regulatory Factor (IRF)-2 in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Cloning and reporter gene activity." *Fish and Shellfish Immunology* 15(5): 473-477.
- Collet, B. and C. J. Secombes (2002). "Type I-interferon signalling in

fish." *Fish Shellfish Immunol* 12(5): 389-397.

Chinchar G, Essbauer S, He JG, Hyatt A, Miyazaki T (2005) Family iridoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., editors. *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 145 - 161

Cui, H., Yan, Y., et al. (2011). "Identification and functional characterization of an interferon regulatory factor 7-like (IRF7-like) gene from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*." *Developmental and Comparative Immunology* 35(6): 672-684.

Dang, W., Zhang, M., et al. (2010). "Differential regulation of *Sciaenops ocellatus* viperin expression by intracellular and extracellular bacterial pathogens." *Fish and Shellfish Immunology* 29(2): 264-270.

Dong, C., Weng, S., et al. (2010). "A new marine megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*." *Virus Research* 147(1): 98-106.

Dong, C., Weng, S., et al. (2008). "Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)." *Virus Research* 135(2): 273-281.

Ellis, A. E. (2001). "Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria." *Developmental and Comparative Immunology* 25(8-9): 827-839.

Escalante, C. R., Yie, J., et al. (1998). "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation." *Nature* 391(6662): 103-106.

Fernández-Trujillo, M. A., Novel, P., et al. (2011). "Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in Gilthead seabream (*Sparus aurata*)." *Molecular Immunology* 48(9-10): 1216-1223.

- Fitzgerald, K. A. (2011). "The interferon inducible gene: Viperin." *Journal of Interferon and Cytokine Research* 31(1): 131-135.
- Fujiki, K., J. Gauley, et al. (2003). "Genomic cloning of novel isotypes of the rainbow trout interleukin-8." *Immunogenetics* 55(2): 126-131.
- Gias, E., C. Johnston, et al. (2011). "Development of real-time PCR assays for detection of megalocytiviruses in imported ornamental fish." *Journal of Fish Diseases* 34(8): 609-618.
- Gu, Z., R. Y. Lee, et al. (2002). "Association of interferon regulatory factor-1, nucleophosmin, nuclear factor-kappaB, and cyclic AMP response element binding with acquired resistance to Faslodex (ICI 182,780)." *Cancer Res* 62(12): 3428-3437.
- Haller, O., P. Staeheli, et al. (2007). "Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense." *Biochimie* 89(6-7): 812-818.
- Harada, H., T. Fujita, et al. (1989). "Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes." *Cell* 58(4): 729-739.
- Harada, H., E. Takahashi, et al. (1994). "Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system." *Mol Cell Biol* 14(2): 1500-1509.
- He, J. G., M. Deng, et al. (2001). "Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus." *Virology* 291(1): 126-139.
- He, J. G., S. P. Wang, et al. (2000). "Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China." *Journal of Fish Diseases* 23(3): 219-222.
- He, J. G., K. Zeng, et al. (2002). "Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)." *Aquaculture* 204(1-2): 11-24.
- Hedrick, R. P. and T. S. McDowell (1995). "Properties of iridoviruses from ornamental fish." *Veterinary Research* 26(5-6): 423-427.
- Holland, J. W., S. Bird, et al. (2008). "Molecular characterization of

- IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation." *Molecular Immunology* 46(2): 269-285.
- Honda, K., Y. Ohba, et al. (2005). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." *Nature* 434(7036): 1035-1040.
- Joon, B. J., Y. K. Ho, et al. (2008). "Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes." *Diseases of Aquatic Organisms* 78(3): 209-215.
- Kawai, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." *Nature Immunology* 5(10): 1061-1068.
- Kimura, T., K. Nakayama, et al. (1994). "Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons." *Science* 264(5167): 1921-1924.
- Kröger, A., M. Köster, et al. (2002). "Activities of IRF-1." *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22(1): 5-14.
- Laing, K. J., J. J. Zou, et al. (2002). "Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Developmental and Comparative Immunology* 26(5): 433-444.
- Lee, J. Y., I. Hirono, et al. (2000). "Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Developmental and Comparative Immunology* 24(4): 407-415.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." *Clinical Microbiology Reviews* 22(2): 240-273.
- Nakaya, T., M. Sato, et al. (2001). "Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283(5): 1150-1156.

- Nehyba, J., R. Hrdličková, et al. (2002). "A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein." *Molecular and Cellular Biology* 22(11): 3942-3957.
- Oshiumi, H., T. Tsujita, et al. (2003). "Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome." *Immunogenetics* 54(11): 791-800.
- Palti, Y., S. A. Gahr, et al. (2010). "Identification, characterization and genetic mapping of TLR7, TLR8a1 and TLR8a2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Developmental and Comparative Immunology* 34(2): 219-233.
- Paperna, I., M. Vilenkin, et al. (2001). "Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish." *Diseases of Aquatic Organisms* 48(1): 17-25.
- Plant, K. P. and R. L. Thune (2008). "Genomic organisation of the channel catfish Mx1 gene and characterisation of multiple channel catfish Mx gene promoters." *Fish and Shellfish Immunology* 24(5): 575-583.
- Purcell, M. K., G. Kurath, et al. (2004). "Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination." *Fish and Shellfish Immunology* 17(5): 447-462.
- Rebl, A., T. Goldammer, et al. (2010). "Toll-like receptor signaling in bony fish." *Vet Immunol Immunopathol* 134(3-4): 139-150.
- Roach, J. C., G. Glusman, et al. (2005). "The evolution of vertebrate Toll-like receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(27): 9577-9582.
- Robertsen, B. (2006). "The interferon system of teleost fish." *Fish and Shellfish Immunology* 20(2): 172-191.
- Rodger, H. D., M. Kobs, et al. (1997). "Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein)." *Journal of Fish Diseases* 20(1): 69-72.
- Sanchez, E., J. Coll, et al. (2007). "Expression of inducible CC

chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8." *Dev Comp Immunol* 31(9): 916-926.

Sangrador-Vegas, A., J. B. Lenington, et al. (2002). "Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization." *Cytokine* 17(2): 66-70.

Stein, C., M. Caccamo, et al. (2007). "Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish." *Genome Biology* 8(11).

Sudthongkong, C., M. Miyata, et al. (2002). "Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami." *Diseases of Aquatic Organisms* 48(3): 163-173.

Sun, B., M. Chang, et al. (2006). "Gene structure and transcription of IRF-2 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with the finding of alternative transcripts and microsatellite in the coding region." *Immunogenetics* 58(9): 774-784.

Sun, B. J., M. X. Chang, et al. (2007). "Gene structure and transcription of IRF-1 and IRF-7 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116(1-2): 26-36.

Sun, B. J. and P. Nie (2004). "Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*." *Vet Immunol Immunopathol* 101(3-4): 161-170.

Suzuki, Y., M. Yasuike, et al. (2011). "Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor 10 (IRF10) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Fish and Shellfish Immunology* 30(1): 67-76.

Tanekhy, M., T. Kono, et al. (2010). "Cloning, characterization, and expression analysis of Toll-like receptor-7 cDNA from common carp, *Cyprinus carpio* L." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 5(4): 245-255.

Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. 19: 623-655.

- Vaughan, P. S., F. Aziz, et al. (1995). "Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2." *Nature* 377(6547): 362-365.
- Verrier, E. R., C. Langevin, et al. "Early antiviral response and virus-induced genes in fish." *Developmental and Comparative Immunology*.
- Xi, H., D. D. Eason, et al. (1999). "Co-occupancy of the interferon regulatory element of the class II transactivator (CIITA) Type IV promoter by interferon regulatory factors 1 and 2." *Oncogene* 18(43): 5889-5903.
- Xiang, Z., C. Dong, et al. (2010). "Characteristics of the interferon regulatory factor pairs zfIRF5/7 and their stimulation expression by ISKNV Infection in zebrafish (*Danio rerio*)."
Developmental and Comparative Immunology 34(12): 1263-1273.
- Xu, X., L. Huang, et al. (2010). "Tetraodon nigroviridis as a nonlethal model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection." *Virology* 406(2): 167-175.
- Yao, C. L., P. Kong, et al. (2010). "Molecular cloning and expression of IRF1 in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*." *Fish and Shellfish Immunology* 28(4): 654-660.
- Yap, W. H., A. Tay, et al. (2003). "Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter." *Immunogenetics* 54(10): 705-713.
- Zhang, Y. B., Q. Li, et al. (2004). "Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon." *Immunogenetics* 56(1): 68-75.